

Untersuchungen über den Gerbstoff des Alkoholextraktes des Fichtenbastes

von

FRANZ LEPPMEIER

Mai 1960 . München.

Untersuchungen über den Gerbstoff des
Alkoholextraktes des Fichtenbastes.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Franz Leppmeier
aus Ingolstadt
Mai 1960

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Grassmann
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Huisgen
- Tag der mündlichen Prüfung: 29. 6. 1960

Meiner lieben Mutter in Dankbarkeit
gewidmet.



Meinem hochverehrten Lehrer
Herrn Prof. Dr. W. Grassmann
möchte ich für die Ermöglichung dieser
Arbeit, sowie für die jederzeit er-
wiesene Belehrung und Unterstützung
meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Herrn Dr. H. Endres, der mir bei dieser
Arbeit wertvolle Anregungen gab und mich
in jeder Weise unterstützte, möchte ich
ebenfalls herzlichst danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Überblick über die Chemie der Fichtenrinde und Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation	7
II. Ergebnisse und Diskussion der vorliegenden Arbeit	12
A Darstellung des alkohollöslichen Rohproduktes und Gerbstoffanreicherung an der Polyamidsäule	12
B Darstellung des Aglucongemisches und Verteilungschromatographie an Polyamid	20
C Untersuchung des Glucosidgemisches	26
D Zur Frage des Vorkommens von "Leuco-anthocyanidinen"	32
E Bestimmung der Verknüpfungsstelle der Glucose im Piceatannolmonoglucosid	33
III. Experimenteller Teil	40
A Untersuchung des Alkoholextraktes	40
1. Darstellung des alkohollöslichen Rohproduktes	40
2. Gerbstoffanreicherung durch Abtrennung der Nichtgerbstoffe an einer Polyamidsäule	43
a) Untersuchung des mit Wasser von der Säule eluierten Nichtgerbstoffs	44
b) Zerlegung des gereinigten Gerbstoffgemisches in einen wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Anteil	47
c) Untersuchung des wasserunlöslichen Anteils auf saure Verbindungen	47
3. Untersuchung des gereinigten wasserlöslichen Gerbstoffgemisches	48
a) Eigenschaften und Klassifikation des Gerbstoffes	48
b) Bestimmung des gebundenen Zuckers im Gerbstoffgemisch	49
4. Verteilungschromatographie des Glucosidgemisches an einer Kieselgel-Zellulosesäule	50

	Seite
5. Präparative Darstellung des Aglucongemiesches und papierchromatographische Untersuchung	53
6. Präparative Verteilungschromatographie des Aglucongemiesches an Polyamid	53
7. Untersuchung der erhaltenen Agluconfraktionen	54
8. Direktkristallisation und Untersuchung der Hauptkomponente des Glucosidgemisches	58
a) Fällung des Glucosids durch Animpfen	58
b) Identifizierung des aus dem krist. Glucosid gewonnenen Aglucons	59
c) Aufnahme des UV-Spektrums und der durch Chelatbildung bedingten Verschiebung	59
d) Bestimmung des gebundenen Zuckers	60
e) Vergleich des durch Direktfällung aus dem Alkoholextrakt gewonnenen Piceatannolmono- glucosids mit dem aus Essigesterextrakt ge- wonnenem krist. Glucosid	60
B Bestimmung der Verknüpfungsstelle der Glucose im Piceatannolmonoglucosid	63
1. Abbau des Tetra-DNP-monoglucosids	63
a) Darstellung des Tetra-DNP-monoglucosids	63
b) Säurehydrolytische Glucoseabspaltung	63
2. Abbau des Tetramethoxypiceatannolmonoglucosids	64
a) Darstellung des Tetramethoxyglucosids	64
b) Das Methoxyaglucon	65
3. Abbau des Acetylpiceatannolmonoglucosids	66
a) Darstellung des Acetylglucosids	66
b) Qualitative Reaktionen des Acetylglucosides	67
c) Oxydative Spaltung des Acetylglucosides	67
d) Entacetylierung und Isolierung der Spaltprodukte	68
e) Säulenchromatographische Auftrennung des Äther- auszugs und Identifizierung des Spaltproduktes	68
4. Abbau des Tetramethoxyacetylmonoglucosids	69
a) Darstellung des Tetramethoxy- acetylmonoglucosides	69
b) Oxydative Spaltung der Verbindung	71

	Seite
c) Entacetylierung und Hydrolyse	71
5. Katalytische Hydrierung des Piceatannolmonoglucosides	74
Anhang: Identifizierung von d-Catechin	74
IV. Zusammenfassung	76
Lebenslauf	

I. Überblick über die Chemie der Fichtenrinde und Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation.

In den letzten Jahren ist es unserem Arbeitskreis gelungen, aus dem Bast der Fichtenrinde mehrere niedermolekulare Gerbstoffbestandteile in einheitlicher Form zu isolieren (1) und in ihrer Konstitution aufzuklären.

Für die Isolierung dieser einheitlichen Verbindungen wurde frischer Bast, unter Ausschluß von Sauerstoff, aufgearbeitet (2). Der Bast wurde mit Chloroform, zur Entfernung der Harze, anschließend mit Essigester, mit Alkohol und Wasser extrahiert.

Die Eigenschaften der erhaltenen drei Fraktionen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

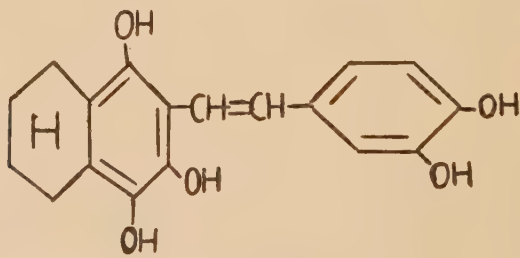
Tabelle 1

Untersuchungen der durch aufeinanderfolgende Extraktion mit Essigester, Alkohol und Wasser erhaltenen Fraktionen (nach Prchal (3)).

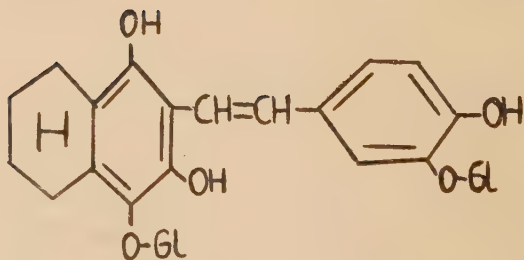
Extrakt	Ausbeute in % des Gesamtgerb- stoffes	An- teil- zahl	% ge- bunde- ner Zucker	Gerb- wert	Bin- dungs- wert	Blößengerb- versuch
Essigester	30	90	30	60	7	ungenügende Gerbung
Alkohol	20	40	20	69	42	gute Gerbung
Wasser	50	58	37	54	37	sehr gut durchgegerb- tes Leder

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß der Essigesterextrakt mit seiner Anteilzahl von 90 als fast reiner Gerbstoff angesprochen werden kann, aber trotzdem nur eine relativ geringe Gerbwirkung zeigte, vermutlich wegen des zu niederen Molgewichts. Es ist natürlich, daß hier die Arbeiten unseres Arbeitskreises begannen.

Als Hauptbestandteil des komplizierten Gerbstoffgemisches des Essigesterextraktes ist das als Piceatannol (4) bezeichnete Pentahydroxystilben (Formel I) anzusprechen, das in der Natur auch in geringer Menge frei vorliegt (5), hauptsächlich jedoch an Glucose gebunden ist (2). Für das 1955 isolierte (2) Piceatannoldiglucosid konnte die Formel II aufgestellt werden (6, 7).



I Piceatannol

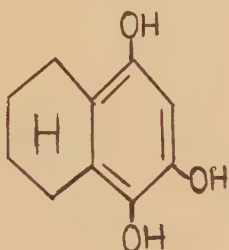


II Piceatannoldiglucosid

(1) vgl. hierzu die zusammenfassende Arbeit: W.Graßmann u. H.Endres, Das Leder 10, 237, (1959);

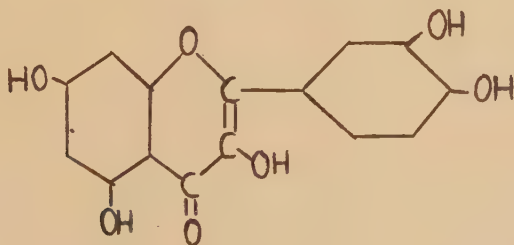
Mengenmäßig weniger wurde auch das an der Stilbendoppelbindung hydrierte Piceatannol, das Dihydropiceatannol isoliert (8, 9), das nach unseren bisherigen Kenntnissen als Monoglucosid im Fichtenbast vorkommt (5).

Sehr interessant ist das Vorkommen eines Monoglucosides, welches die Tetralinhälfte des Piceatannols (Formel III) enthält (10). Das Auffinden dieser Verbindung könnte für die Biosynthese des Piceatannols von Bedeutung sein.



III 1,2,3,4-Tetrahydro-5,7,8-trihydroxynaphthalin

Neben diesen Verbindungen, die einen vollkommen neuen Typ in der Klasse der kondensierbaren Gerbstoffe darstellen, wurde noch ein Quercetinglucosid isoliert (5) (Formel IV).



IV Quercetin

(2) W.Graßmann, G.Deffner, E.Schuster u. W.Pauckner, Chem. Ber. 89, 2523, (1956).

(3) K.Prchal, Diplomarbeit Universität München 1953.

(4) W.Graßmann, H.Endres u. W.Pauckner, Chem.Ber.91, 134 (1958)

(5) K.Merkle, Dissertation TH Stuttgart 1959.

In der nachfolgenden Tabelle sind die bisher aus dem Essigesterextrakt isolierten Verbindungen mit ihren Ausbeuten zusammengefaßt:

Tabelle 2

Bisher aus Fichtenrindenbast (Essigesterextrakt) isolierte Verbindungen:

Substanz	Schmelzpunkt	Ausbeute in % +)
Piceatannol-diglucosid	228° (Z)	12
Dihydropiceatannol-monoglucosid	233° (Z)	3
Piceatannol	215°	2
Trihydroxytetralin-monoglucosid	207°	1
Quercetin-glucosid	-	2

+) Bezogen auf den Gesamtgerbstoff des Bastes.

-
- (6) W.Graßmann, H.Endres, R.Brockhaus u. K.Merkle, Chem. Ber. 90, 2416 (1957).
(7) H.Endres, Chem. Ber. 91, 636 (1958).
(8) W.Graßmann, H.Endres, W.Pauckner u. H.Mathes, Chem. Ber. 90, 1125 (1957).
(9) H.Endres, W.Graßmann u. H.Mathes, Chem. Ber. 91, 141 (1958).
(10) H.Endres, K.Merkle u. H.Bauriedel, Chem.Ber. in Vorber.

Der Alkoholextrakt mit einer Anteilzahl von 40 dagegen, enthält schon sehr viele Nichtgerbstoffe (Tabelle 1). In den Blößengerbversuchen zeigt jedoch der Alkoholextrakt ein weit besseres Gerbvermögen als der Essigesterextrakt, was dahin gedeutet wurde, daß der letztere im wesentlichen niedermolekulare Gerbstoffe enthält, der Alkoholextrakt aber bereits kondensierte Gerbstoffe, die durch ihre Molekülgröße einen besseren Gerbeffekt aufweisen.

Daß diese Vermutung für den Essigesterextrakt richtig ist, konnte in den oben genannten Arbeiten, in denen fast 90 % der phenolischen Substanzen identifiziert werden konnten, bestätigt werden. Die Untersuchung des Alkoholextraktes und die Isolierung einheitlicher Substanzen sind Thema der vorliegenden Arbeit.

II. Ergebnisse und Diskussion der vor- liegenden Arbeit.

A Darstellung des alkohollöslichen Rohproduktes und Gerbstoffanreicherung an der Polyamidsäule.

Es wurde ein nach der Vorschrift von Graßmann und Mitarbeiter (2) mit Chloroform und Essigester vorextrahierter Fichtenbast verwendet. Aus 880 g trockenem, vorextrahiertem Bast (Erntezeit: März 1957) konnten 105 g (entsprechend 11,9 %) an Alkoholextrakt, mit 33 % Gerbstoff, erhalten werden (vgl. Exp. Teil A 1).

Im Gegensatz zum Essigesterextrakt trat hier die ers Schwierigkeit in der Anreicherung des Gerbstoffes auf.

Die gebräuchlichste Methode zur Gerbstoffreindarstellung ist die Fällung des Gerbstoffs mit neutralem Bleiacetat; basisches Bleiacetat fällt viele andere Beimengungen mit (11). Der Bleiniederschlag wird dann zerlegt, und zwar am besten mit Schwefelsäure, da das durch Schwefelwasserstoff gefällte Bleisulfid leicht unverändertes Bleisalz einschließt und Gerbstoff absorbiert und da Schwefelsäure in der Kälte zu arbeiten gestattet. Das Filtrat, das außer dem Gerbstoff Essigsäure, andere Säuren, Pektine und Farbstoffe enthält, wird dann im Vakuum eingeeengt.

Diese bisher bekannten Verfahren zur Anreicherung pflanzlicher Gerbstoffe, die erfahrungsgemäß auch schlechte Ausbeuten liefern, konnten wegen der Empfindlichkeit des Fichtengerbstoffes keine Anwendung finden, und es mußte eine schonendere Methode ausgearbeitet werden.

Nachdem an unserem Institut gezeigt worden war, daß Gerbstoffe eine große Affinität zu Polyamid aufweisen und Trennungen von Gerbstoffgemischen an solchen Polyamidsäulen gelungen waren (1, 8, 12), lag es nahe, eine Gerbstoffan-

(11) H.Gnam, Die Gerbstoffe und Gerbmittel, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1949.

(12) H.Endres, Das Leder 8, 222 (1958).

reicherung an einer Polyamidsäule zu versuchen (vgl.III. A.2).

Tatsächlich konnte an Polyamid eine ausgezeichnete Reinigung erzielt werden.

Das Ergebnis dieser säulenchromatographischen Reinigung ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Reinigung des Alkoholextraktes an einer Polyamidsäule
 Füllhöhe der Säule 37 cm, Durchmesser 6 cm.
 Aufgetragen 15 ml Extrakt mit 15 g Trockensubstanz (entsprechend 5 g Reingerbstoff) gelöst in Wasser.

Eluiert mit	Ausbeute				Anteil- zahl
	Trockensubstanz		Gerbstoff		
	g	% ⁺)	g	% ⁺)	
Wasser 16 l	8,4	56	-	-	-
Methanol 7 l	4,8	32	3,1	62	83
Dimethylform- amid 2 l	0,4	2,7	0,35	7	85

Summe: 13,6 90,7 3,45 69
 =====

⁺) bezogen auf den eingesetzten Alkoholextrakt.

Mit Wasser konnten erwartungsgemäß die nichtphenolischen Substanzen nahezu quantitativ eluiert werden. Die auf der Säule verbliebenen Substanzen, die weitgehend als Polyphenole (Gerbstoffe) angesprochen werden können, wurden nach Elution mit 7 l Methanol und 2 l Dimethylformamid in hochangereicherter Form erhalten.

Diese neue Methode liefert einen Gerbstoff von der Anteilzahl 84 mit einer Ausbeute von rund 70 % bezogen auf den aufgetragenen Reingerbstoff. Es konnte insgesamt 90 % der Einwaage eluiert werden; der Rest, der -wie später gezeigt wird- zumindest teilweise aus kondensierten Catechinen besteht, verblieb auf der Säule. Papierchromatographisch konnte keine Veränderung des Gerbstoffes während der Reinigungsoperation festgestellt werden.

Nach dieser Methode konnte später H. Bauriedel (13) aus Fichtennadelextrakten, die 43 % Gerbstoff enthielten, 90 % des eingesetzten Gesamtgerbstoffes erhalten und die Anteilzahl auf rund 85 erhöhen.

Der mit Wasser von der Säule eluierte Anteil gab mit Eisenalaun keine Phenolreaktion, war also gerbstofffrei. Die Untersuchung des Nichtgerbstoffes auf frei vorliegenden, reduzierenden Zucker nach Hagedorn-Jensen (14) ergab 28 %, bezogen auf die Nichtgerbstoffmenge und berechnet als Glucose. Um die Art der frei vorliegenden Zucker festzustellen, wurde die Nichtgerbstofflösung mit Vergleichssubstanzen papierchromatographisch untersucht. Neben Glucose, die den Hauptteil der Zucker ausmachte, konnte noch Fruktose und ein Oligosaccharid nachgewiesen werden. Der gebunden vorliegende Zucker wurde nach enzymatischer Spaltung zu 16 % gefunden.

Das von Neish (15) aus der Coloradofichte isolierte Pungenin (4-Hydroxy-3-glucosido-acetophenon), das strukturell als Vorstufe des Piceatannolglucosids in Betracht kommen könnte und mit Wasser von einer Polyamidsäule eluierbar ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Auch bei der papierchromatographischen Untersuchung des rohen Alkoholextraktes war kein Pungenin aufzufinden.

(13) H. Bauriedel, Diplomarbeit Universität München 1958.

(14) Hagedorn-Jensen, Biochem. Zeitschrift Bd. 135, S. 46.

(15) A. Neish, Can. J. Biochem. Physiol. 35 (1957).

Ein weiterer Teil der Nichtgerbstoffe besteht aus mit Ninhydrin anfärbbaren Substanzen. Beim Besprühen treten 10 Flecken auf, die nicht von Peptiden herrühren können, denn nach Säurehydrolyse hat sich weder die Zahl noch die Anordnung der Flecken verändert. Es dürfte sich demnach um Aminosäuren oder/und um Amine handeln.

Von dem mit Methanol von der Säule eluierten Polyphenolgemisch (Gerbstoffe) sind etwa 20 % in Wasser unlöslich.

Das goldgelbe, gut wasserlösliche Gerbstoffgemisch, das durch Säulenreinigung mit einer Anteilzahl von 84 erhalten wurde, kann auf Grund durchgeführter qualitativer Gerbstoffreaktionen der Gruppe der sog. Pyrocatechingerbstoffe, also der Brenzcatechinderivate zugeordnet werden, während Pyrogallolgerbstoffe eindeutig nicht nachgewiesen werden konnten (vgl. III A 3 a).

Da zuerst dargestellte eindimensionale Papierchromatogramme wegen der zahlreichen, mit Phenolreagenz anfärbenden Flecken recht unübersichtlich waren, wurden zweidimensionale Chromatogramme hergestellt. Abb. 1 zeigt, daß mit den Lösungsmitteln n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3) eine Auftrennung in 17 Flecken erfolgte, die größtenteils im UV-Licht fluoreszierten und teilweise nicht mit Eisenalaun, sondern nur mit dem viel empfindlicheren diazotierten Benzidin sichtbar gemacht werden konnten. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß mitunter mengenmäßig sehr kleine, stark fluoreszierende Komponenten unverhältnismäßig stark hervortreten.

Die Rf-Werte der in Abbildung 1 erhaltenen Flecken, das Verhalten im UV-Licht und Anfärbung sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Beim Besprühen mit Vanillin-Salzsäure-Reagens, das nur mit Catechinen und Leucoanthocyanidinhydraten -jedoch nicht mit Piceatannol oder dessen Derivaten- eine Rotfärbung gibt, ergab das zweidimensionale Papierchromatogramm des ungereinigten, rohen Alkoholextraktes eine breite, ver-

waschene, rotanfärbende Zone (Abb. 2), die bei dem über die Säule gereinigten Alkoholextrakt völlig fehlt (Abb. 1).

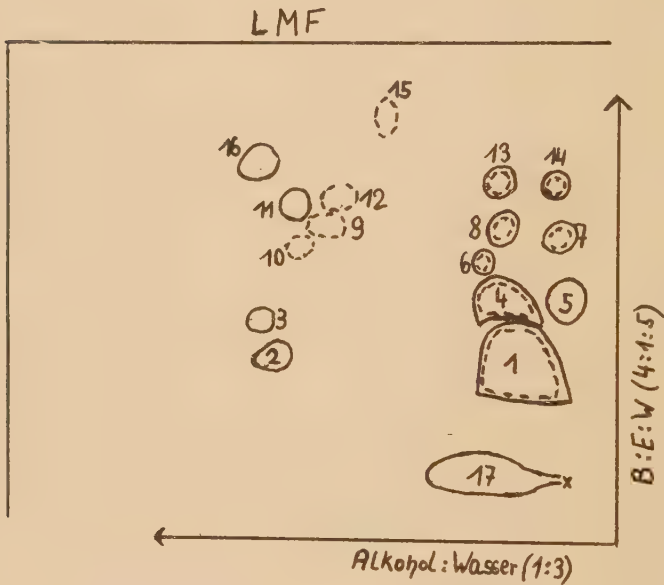


Abb. 1; Zweidimensionales Papierchromatogramm des säulenchromatographisch gereinigten, waserlöslichen Alkoholextraktes.

Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3);
ausgezogene Linien: im UV-Licht fluoreszierende Flecken, gestrichelte Linien: anfärbbar mit diaz. Benzidin.

Tabelle 4

Rf-Werte, Verhalten im UV-Licht, Anfärbung mit Fe^{III} und diaz. Benzidin der in Abb. 1 gezeigten Flecken.

Fleck	Rf-Wert mit		UV-Licht	Anfärbung mit Eisenalaun	diaz.Benz.
	Ä:W	B:E:W			
1	0,19	0,38	blauviolett	rosa/graugrün	purpur
2	0,59	0,33	blauviolett	--	--
3	0,63	0,42	blauviolett	--	--
4	0,22	0,49	blauviolett	grüngrau	rosa
5	0,00	0,46	gelb	--	--
6	0,23	0,56	blauviolett	--	orange
7	0,06	0,63	blauviolett	graugrün	rot-lila
8	0,19	0,63	blauviolett	--	rot-lila
9	0,50	0,63	keine	gelbgrün	orangerot
10 ⁺)	0,63	0,61	keine	--	--
11	0,58	0,67	blauviolett	--	--
12	0,50	0,69	keine	--	gelb
13	0,21	0,72	blauviolett	--	rosa
14	0,08	0,74	blauviolett	rosa/graugrün	rosa-purpur
15	0,73	0,82	keine	graugrün	orange
16	0,60	0,75	blauviolett	--	--
17	0,15	0,00	blauviolett	--	--

⁺) Rotfärbung mit Vanillin-Salzsäure-Reagens zeigt nur Fleck 10.

Die Aufstellung einer Tabelle für das Chromatogramm des rohen Alkoholextraktes mit den in Tabelle 4 angeführten Untersuchungsmethoden ist nicht möglich, da sich wegen der Anwesenheit der Kondensationsprodukte und Nichtgerbstoffe verwaschene Zonen ergaben.

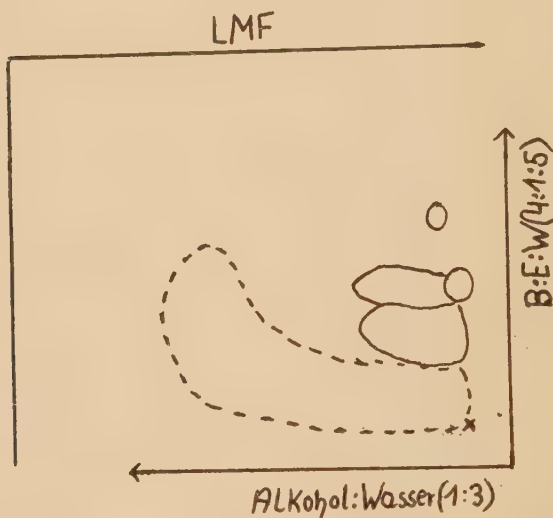


Abb.2 Zweidimensionales Papierchromatogramm des rohen Alkoholextraktes.

Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3).

Ausgezogene Linien: im UV-Licht fluoreszierende Flecken, gestrichelte Linie:

Rotfärbung mit Vanillin-Salzsäure-Reagens.

Die rotanfärbende Substanz wird also an der Polyamidsäule so fest gebunden, daß sie mit den benützten Lösungsmitteln nicht eluierbar ist. Da die Affinität der Gerbstoffe zu Polyamid bzw. Hautpulver ihrer Gerbwirkung parallel läuft (16, 17), sollte es sich um einen hochaffinen Gerbstoff

handeln. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß es sich um Chinone handelt, die irreversibel mit dem Polyamid reagieren (1, 18).

Der gereinigte Alkoholextrakt gibt mit Vanillin-Salzsäure-Reagens einen äußerst schwachen roten Flecken (Abb. 1, Fleck 10; siehe auch Tab.4). Durch Ausschütteln des gereinigten, trocknen Alkoholextrakts mit Äther läßt sich die Vanillin- Salzsäure positive Substanz anreichern. Erneute chromatographische Untersuchung mit d-Catechin als Vergleichssubstanz läßt die Anwesenheit von d-Catechin im Alkoholextrakt vermuten. Nach zweimaliger papierchromatographischer Reinigung zeigte die isolierte Verbindung ein mit d-Catechin identisches UV-Absorptionspektrum (vgl. Anhang). Es kann damit die Anwesenheit von d-Catechin, wenn auch in verschwindender Menge, im Alkoholextrakt als sicher gelten.

Wenn d-Catechin im Alkoholextrakt vorhanden ist, dann besteht auch die Möglichkeit, daß die im rohen Alkoholextrakt mit Vanillin-Salzsäure rot färbende Zone Catechin-kondensationsprodukte sind. Tatsächlich zeigt oxydativ oder mit verdünnter Salzsäure kondensiertes Catechin papierchromatographisch das gleiche Verhalten.

Um den gebundenen Zucker im gereinigten wasserlöslichen Gerbstoff quantitativ zu erfassen, wurde der Zucker sowohl säurehydrolytisch als auch enzymatisch mit dem Glucosidasegemisch aus *Aspergillus oryzae* abgespalten und nach Hagedorn-Jensen (14) bestimmt. Die übereinstimmenden Werte ergaben einen gebundenen Zucker von 19,5 % bezogen auf Reingerbstoff mit der Anteilzahl 100, im Gegensatz zum

[16] W.Graßmann, Das Leder 9, 193 (1958).

[17] M.Oppelt, Dissertation Universität München 1958.
W.Graßmann, H.Endres, M.Oppelt u. H.El.Sissi,
Das Leder 10, 149 (1959).

[18] H.Endres, W.Graßmann u. M.Oppelt, Hoppe-Seyler-Z.,
317, 21 (1959).

Essigsterextrakt, der nach früheren Arbeiten (2) 30 % gebundene Glucose enthält. Die papierchromatographische Untersuchung zeigte, daß -wie beim Essigsterextrakt- der Gerbstoff nur gebundene Glucose enthält.

Der Versuch, das Glucosidgemisch auf einer Kieselgel-Zellulose-Säule in die einzelnen Komponenten zu zerlegen (vgl. III A 4), führte zu keinem befriedigenden Ergebnis. Zwar konnte das Glucosidgemisch in 4 Fraktionen aufgetrennt werden, aber die papierchromatographische Untersuchung der erhaltenen Fraktionen läßt nur eine teilweise Fraktionierung erkennen; es konnte keine Komponente rein erhalten werden.

B Darstellung des Agluongemisches und Verteilungschromatographie an Polyamid.

Die Darstellung des Agluongemisches und dessen Auftrennung an Polyamid versprach mehr Erfolg. Die Glucose wurde enzymatisch abgespalten und die Aglucone mit Essigster ausgeschüttelt. Die Agluconausbeute entsprach 82 % der Theorie (vgl. III A 5).

Das zweidimensionale Papierchromatogramm (Abb. 3) zeigt 13 Flecken. Die Rf-Werte der einzelnen Flecken, ihr Verhalten im UV-Licht und ihre Anfärbbarkeit sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Die Auftrennung an einer Polyamidsäule ergab 6 Fraktionen, die als A₁ - A₆ bezeichnet wurden (Abb. 4a). Die gravimetrisch bestimmte Gesamtausbeute betrug nach Verwerfen kleinerer Zwischenfraktionen rund 80 % des aufgetragenen Agluongemisches (vgl. III A 6).

Als papierchromatographisch weitgehend einheitlich erwies sich nur die Hauptfraktion A₄, völlig einheitlich die Fraktion A₆, die jedoch nur 2 % der aufgetragenen Menge betrug. Alle Versuche diese letztere Substanz zu kristallisieren scheiterten bisher.

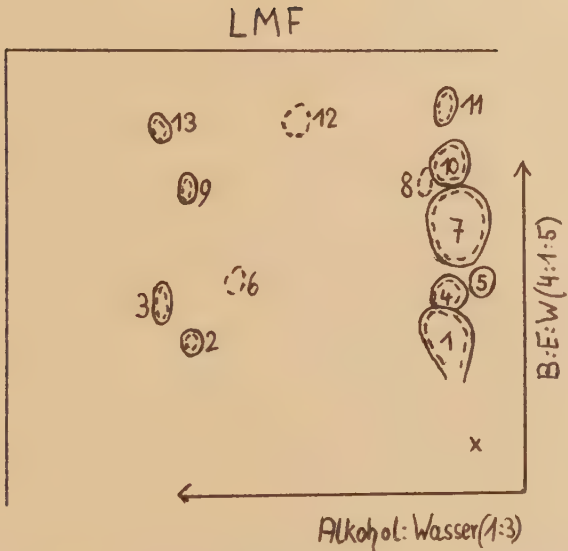


Abb. 3; Zweidimensionales Papierchromatogramm des Aglucongemiesches des Alkoholextraktes.
Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3).
Ausgezogene Linien: im UV-Licht fluoreszierende Flecken, gestrichelte Linien: anfärbbar mit diaz. Benzidin.

Die Hauptfraktion A₄, die mit dem in der Tabelle 5 aufgeführten Fleck 7 identisch ist und etwa 50 % der aufgetragenen Menge ausmacht, konnte kristallin erhalten werden. Nach mehrmaligem Umkristallisieren schmolzen die weißen, wetzsteinförmigen Kristalle bei 215° unter Zersetzung. Papierchromatographisch verhält sich diese Substanz wie das aus der Essigesterfraktion kristallin erhaltene Piceatannol, das den gleichen Zersetzungspunkt aufweist; auch die UV-Absorptionsspektren sind identisch (Abb. 7a).

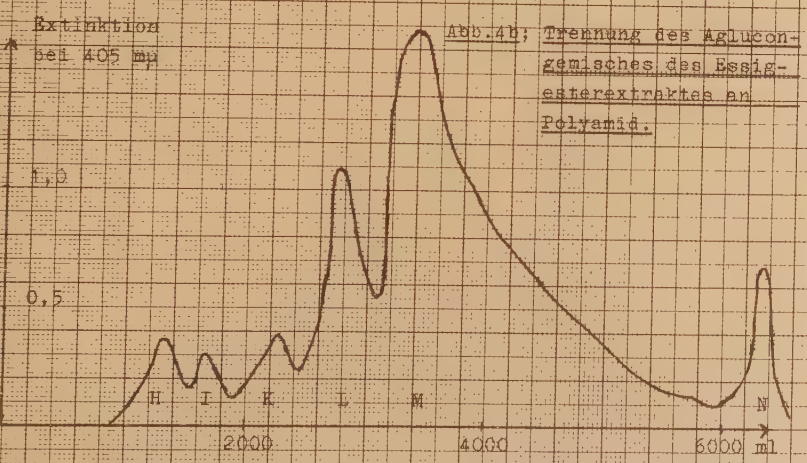
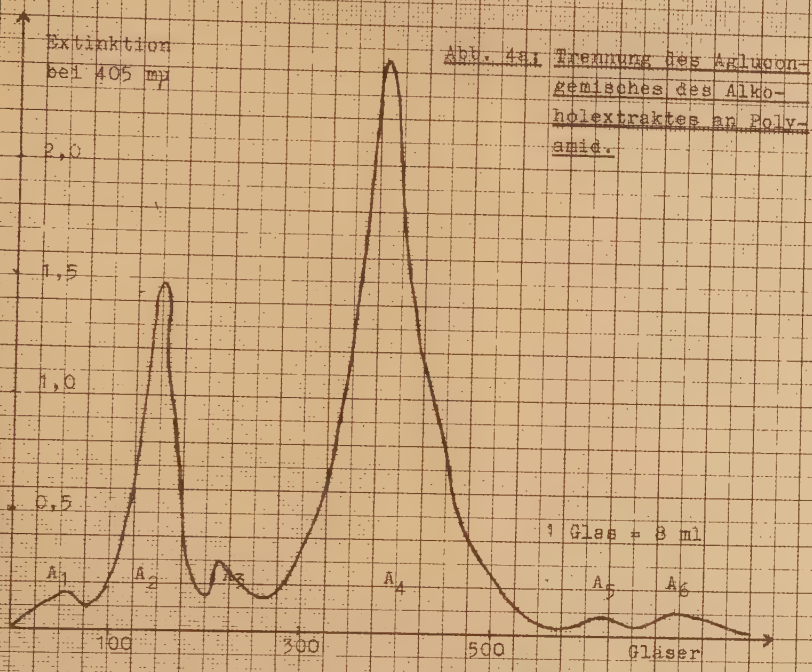
Tabelle 5

Rf-Werte, Verhalten im UV-Licht, Anfärbung mit Fe^{III} und diaz. Benzidin der in Abb. 3 gezeigten Flecken.

Fleck	Rf-Wert mit		UV-Fluoreszenz	Anfärbung mit	
	Ä:W	B:E:W		Eisenalaun	diaz. Benz.
1	0,12	0,42	blauviolett	graugrün	rosa
2	0,62	0,45	blauviolett	--	orange
3	0,69	0,55	blauviolett	--	rotbraun
4	0,09	0,51	blauviolett	graugrün	purpur
5	0,00	0,57	gelb	--	--
6 ⁺)	0,68	0,69	keine	--	--
7	0,12	0,73	blauviolett	rosa/graugrün	purpur
8	0,12	0,79	keine	graugrün	orange
9	0,56	0,76	blauviolett	graugrün	rosa-violett
10	0,06	0,82	blauviolett	grün	rosa
11	0,04	0,94	blauviolett	grüngrau	rosa
12	0,42	0,90	keine	rosa	orange
13	0,63	0,88	blauviolett	graugrün	rosa

⁺) Rotfärbung mit Vanillin-Salzsäure-Reagens

Zur weiteren Identifizierung wurde das Acetylprodukt der Agluconfraktion 4 dargestellt. Die in schönen, weißen Nadeln kristallisierende Substanz zeigte nach Umkristallisation einen Schmelzpunkt von 124° . Der Mischschmelzpunkt mit dem bei 124° schmelzenden Pentaacetylderivat des Piccatannols zeigte keine Depression. 50 % des Aglucongemisches des Alkoholextrakts sind demnach identisch mit



Piceatannol, das auch die Hauptkomponente der Aglucone des Essigesterextraktes bildet.

Die aus der Säule papierchromatographisch rein erhaltene Fraktion A₆ mit dem Rf-Wert 0,91 mit n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) zeigt im UV-Absorptionsspektrum ein dem Piceatannol etwas ähnliches Verhalten (Abb. 7b und 7a). Bemerkenswert ist jedoch, daß neben dem für Piceatannol weitgehend charakteristischen Maximum bei 325 m μ noch -wie beim Dihydropiceatannol (Abb. 7b)- ein Maximum bei 290 m μ auftritt und die beim Piceatannol auftretende Schulter bei 315 - 318 m μ stark erhöht ist. Das von der nichtkristallinen, gelbbraunen Substanz aufgenommene IR-Spektrum (Abb. 5) ist dem des Piceatannols (Abb. 6) weitgehendst ähnlich.

Die Fraktion A₂, die 22 % des Aglucongemiesches beträgt, besteht hauptsächlich aus 2 Komponenten mit den deutlich verschiedenen Rf-Werten von 0,26 und 0,59. Erneute Fraktionierung über Polyamid ergab wieder nur 1 Maximum im Auslaufchromatogramm und 2 Flecken bei der papierchromatographischen Untersuchung. H. Mathes (19) erhielt durch Auftrennung des aus dem Essigesterextrakt gewonnenen Aglucongemiesches an Polyamid eine sich völlig gleich verhaltende Fraktion mit identischen Rf-Werten (Fraktion I und K). Versuche, die Komponenten der Fraktion A₂ nach papierchromatographischer Trennung rein zu isolieren, schlugen fehl. Selbst nach zweimaliger papierchromatographischen Trennung wurden die beiden Flecken im gleichen Mengenverhältnis erhalten.

Die übrigen Fraktionen, die durch Säulenchromatographie nicht völlig rein anfielen, wurden papierchromatographisch gereinigt und ihre UV-Spektren in alkoholischer Lösung gemessen. Wie aus den Abbildungen 7a und 7b hervorgeht, zeigen alle Kurven einen unter sich und mit Piceatannol sehr

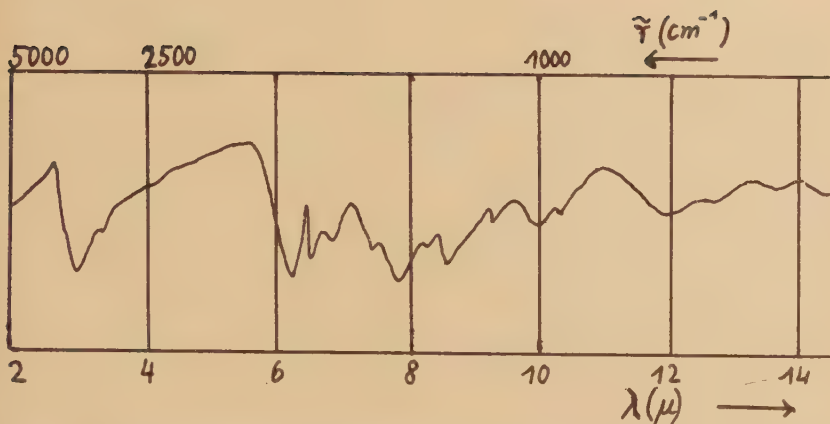


Abb. 5; IR-Spektrum von Aglucon A₆;
Lösungsmittel KBr; 850/300 mg KBr.

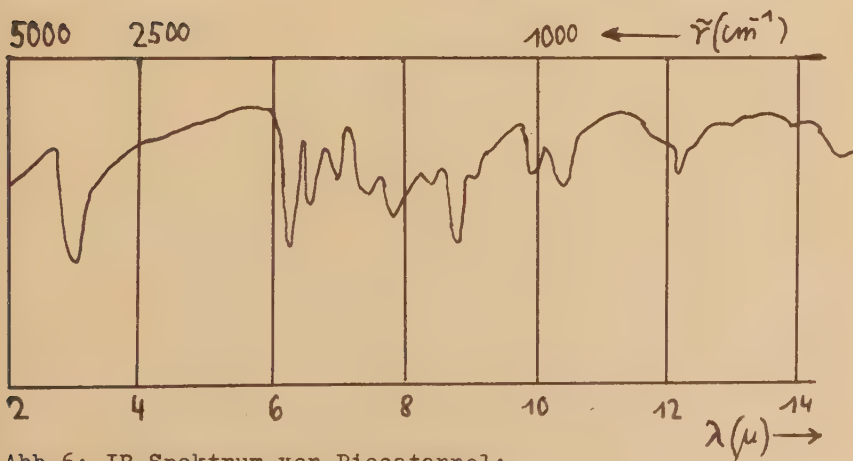


Abb. 6; IR-Spektrum von Piceatannol;
Lösungsmittel KBr; 380/200 mg KBr.

ähnlichen Verlauf. Eine Ausnahme bildet nur das Spektrum der Fraktion A₃, das mit dem UV-Spektrum von Dihydropiceatannol identisch ist (Abb. 7b).

Auf Grund der Ähnlichkeit dieser Ergebnisse mit denen des Essigesterextraktes wurden die säulenchromatographischen Elutionskurven und die zweidimensionalen Papierchromatogramme des Aglucongemesches aus dem Essigesterextrakt mit denen des aus dem Alkoholextrakt dargestellten Aglucongemesches verglichen und eine auffallende Übereinstimmung festgestellt (Abb. 4a und 4b; Abb. 3 und 8). Geringfügige Unterschiede waren nur quantitativer Natur.

Durch Vergleich der Rf-Werte an Polyamid, Vergleich der Elutionskurven, Verhalten im UV-Licht, Anfärbbarkeit und durch papierchromatographische Untersuchungen zeigte sich, daß

Fraktion A₁ mit dem -aus dem Essigesterextrakt an der Polyamidsäule erhaltenen- noch unbekannten Aglucon H,

Fraktion A₂ mit dem gleichfalls noch unbekannten I u. K,

Fraktion A₃ mit Dihydropiceatannol und

Fraktion A₄ mit Piceatannol

identisch ist. Die Fraktionen A₅ und A₆, die sehr fest auf der Polyamidsäule haften, waren bei früher erfolgten Trennungen der Essigesterfraktion an Polyamid wohl durch Elution mit n/10 Natronlauge, zusammen mit Kondensationsprodukten, als Fraktion N eluiert worden (8).

C Untersuchung des Glucosidgemisches.

Nachdem der in dieser Arbeit verwendete Bast erschöpfend mit Essigester extrahiert war und trotzdem die Aglucone des Essigester- und Alkoholextraktes identisch sind, müßte man annehmen, daß die unterschiedliche Extrahierbarkeit der Glucoside auf der verschiedenen Zahl und Anordnung der Glucosereste beruht. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, da ja festgestellt wurde, daß der Alkoholextrakt nur 20 % gebundene Glucose enthält.

Überraschenderweise konnten aber durch Animpfen des Alkoholextraktes mit aus der Essigesterfraktion gewonnenem

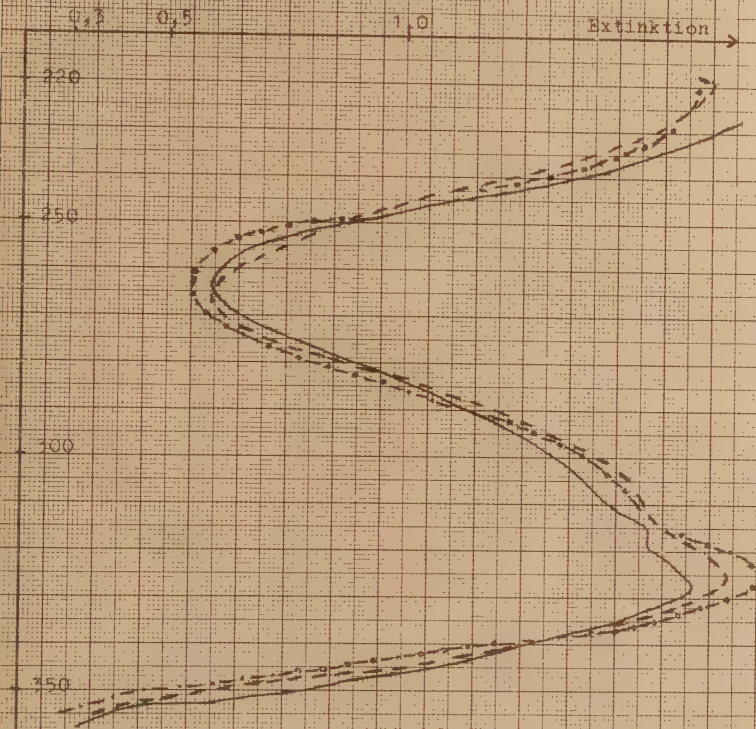


Abb. 7a: UV-Absorptionsspektren von

— A_2
 - - - A_4
 - · - · - Piccatannol

gemessen in Äthylalkohol.

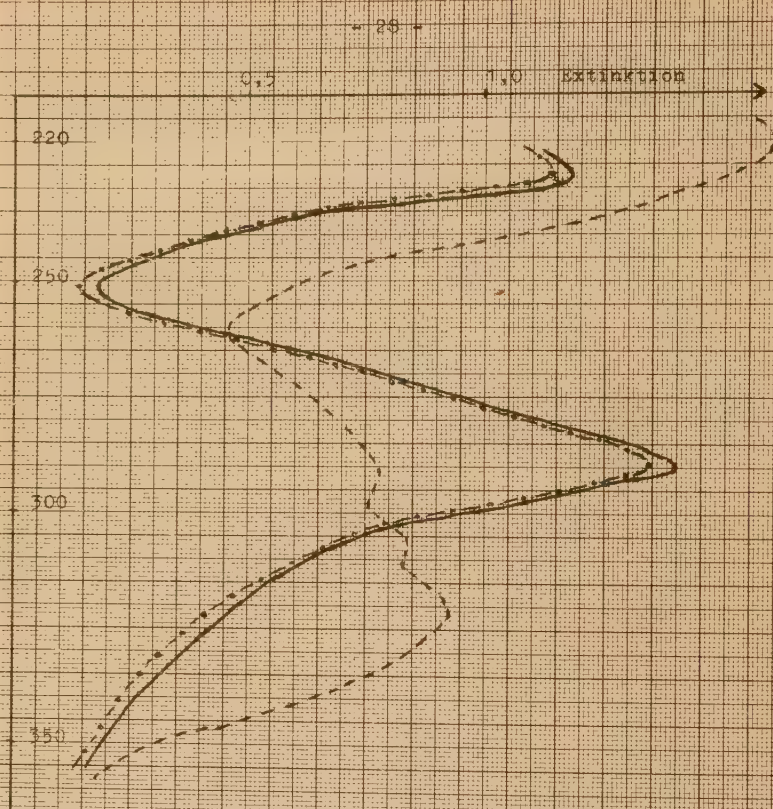


Abb. 7c: UV-Absorptionsspektren von

- A₃
 - - - A₆
 - · - · - Dihydropiceatannol
- gemessen in Äthylalkohol.

λ
(nm)

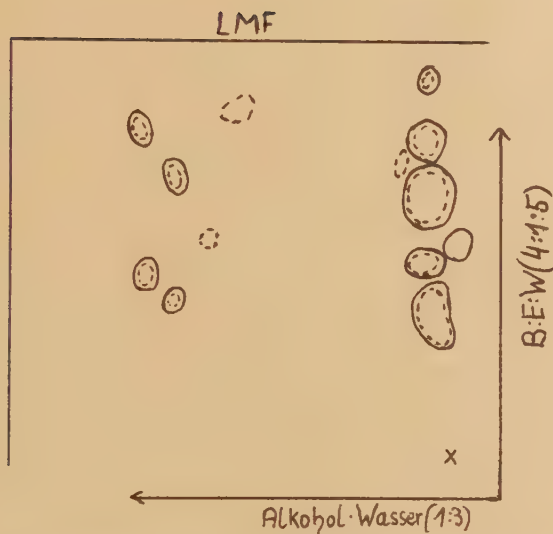


Abb. 8; Zweidimensionales Papierchromatogramm des Aglucongемisches des Essigesterextraktes.

Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3).

Ausgezogene Linien: im UV-Licht fluoreszierende Flecken, gestrichelte Linien: anfärbbar mit diaz. Benzidin.

Piceatannolglucosid insgesamt 50 % bezogen auf Reingerbstoff als weiße, wetzsteinförmige Kristalle gewonnen werden. Nach Umkristallisation schmolzen die weißen Kristalle -wie Piceatannoldiglucosid- bei 226° unter Zersetzung. Es schien sich also zunächst ebenfalls um ein Diglucosid des Piceatannols mit der beschriebenen Glucoseanordnung zu handeln. Damit steht aber der zu niedrige Zuckergehalt des Glucosidgemisches in Widerspruch.

Die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums in alkoholischer Lösung ergab denselben Kurvenverlauf, wie er für das Diglucosid beschrieben worden war. Während aber beim Diglu-

cosid durch Aluminiumchloridzusatz keine Verschiebung zu beobachten war (12), wurde hier durch Chelatbildung das Maximum von 327 nach 346 m μ und das Minimum von 265 nach 275 m μ verschoben (Abb. 9). Es müssen also hier zumindest zwei freie o-ständige Hydroxylgruppen vorliegen (vgl. III.A 8 c).

Zur Bestimmung der gebundenen Glucose wurde der Zucker enzymatisch und säurehydrolytisch abgespalten und colorimetrisch nach der Osazonmethode (20) bestimmt. Die gut übereinstimmenden Werte ergaben einen Gehalt von rund 38 % Glucose (berechnet für Diglucosid 56%). Das zugehörige Aglucon wurde nach der enzymatischen Spaltung ausgeschüttelt und die gewonnenen weißen Kristalle als Piceatannol identifiziert. Die erhaltenen Glucosewerte (38 %) stimmen sehr gut mit dem, für ein Monoglucosid des Piceatannols berechneten Wert von 37,7 % überein (vgl. III A 8 d).

Als daraufhin das als Impfkristall verwendete Piceatannol-glucosid aus dem Essigesterextrakt untersucht wurde, zeigte es sich, daß es sich auch hier um ein Monoglucosid handelte.

In mehreren Aufarbeitungen des Essigesterextraktes, die nach einer vereinfachten Methode erfolgten, wurde das Diglucosid vermißt. Nach den derzeitigen Befunden wird das Diglucosid nur während einer verhältnismäßig kurzen Zeit im Sommer angetroffen.

Die einzelnen, inzwischen isolierten und aufgeklärten Nebenfraktionen der Glucoside des Essigesterextraktes (5) konnten alle auch im Alkoholextrakt aufgefunden werden. Auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen mit Vergleichssubstanzen konnten folgende, in Abb. 1 gezeigte

(20) W.Graßmann, H.Hörmann u. R.Hafter, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 87, 307 (1957).

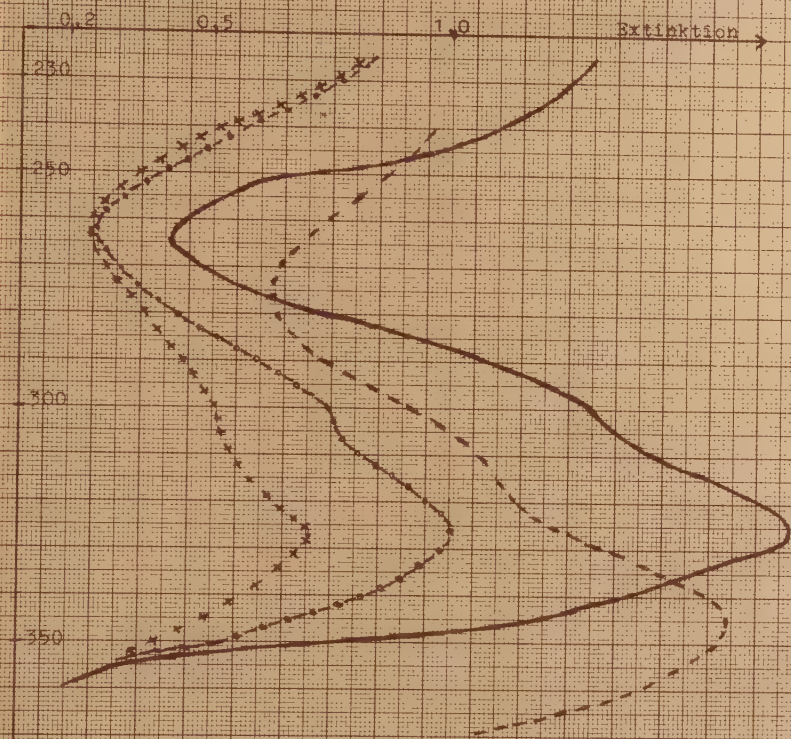


Abb. 9: UV-Absorptionsspektren von

- krist. Piceatannolmonoglucosid, gemessen in Äthylalkohol
- - - krist. Piceatannolmonoglucosid, gem. in alkohol, $AlCl_3$ -Lösung
- · - · - krist. Piceatannoldiglucosid, gemessen in Äthylalkohol *)
- · · · krist. Piceatannoldiglucosid, gemessen in alkohol, $AlCl_3$ -Lösung *)

*) gemessen von H. Macho (19).

Flecken identifiziert werden:

- Fleck 1 : Piceatannolmonoglucosid
- 5 : Quercetinmonoglucosid
- 9 : Dihydropiceatannolmonoglucosid
- 10 : d-Catechin
- 12 : Tri-hydroxy-tetralin-glucosid
- 14 : Piceatannol

Ein, mit 26 %iger Ausbeute aus dem Essigesterextrakt von Fichtennadeln isoliertes (21), jedoch noch nicht identifiziertes, Flavanol konnte ebenfalls im rohen Alkoholextrakt, nach Anreicherung mit Äther, papierchromatographisch in verschwindender Menge nachgewiesen werden.

D Zur Frage des Vorkommens von "Leuco - anthocyanidinen".

In den letzten Jahren konnten aus verschiedenen Pflanzen, die kondensierbare Gerbstoffe enthielten, Flavandiole ("Leuco-anthocyanidine") isoliert werden (22). Als Nachweis auf Flavandiole wird die rote Vanillin-Salzsäure-Reaktion -die aber auch für Catechine positiv verläuft- und die mit Isoamylalkohol ausschüttelbare Rotfärbung beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure angeführt (23). Letztere Reaktion, die die Catechine nicht ergeben, beruht auf einer teilweisen Überführung der Flavandiole in die entsprechenden Anthocyanidine, die dann papierchromatographisch identifiziert werden können. Der Alkoholextrakt des Fichtenbastes gibt mit Vanillin-Salzsäure, wie bereits beschrieben, eine Rotfärbung; die Träger dieser Reaktion sind die Catechine. Wegen der Anwesenheit der Catechine

(21) W.Maass, unveröffentlicht.

(22) Bate-Smith, J. Expt. Bot. 4, 1 (1953);
Biochem. J. 58, 122 (1954).

(23) Bate-Smith u. Lerner, Biochem. J. 58, 126 (1954).

ist die gleichzeitige Anwesenheit von Flavandiolen mit dieser Reaktion allein nicht festzustellen. Beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure gibt sowohl der gereinigte, wie der ungereinigte Alkoholextrakt eine mit Isoamylalkohol ausschüttelbare rote Farbe. Bei der papierchromatographischen Untersuchung der Isoamylalkohol-Phase konnte jedoch kein den Anthocyanidinen ähnlicher Fleck nachgewiesen werden. Wie inzwischen von H. Endres gezeigt wurde (24), gibt jedoch auch Piceatannol und das inzwischen ebenfalls im Fichtenbast gefundene Trihydroxytetralin (5) beim Erhitzen mit 2n-Salzsäure eine solche mit Isoamylalkohol ausschüttelbare Rotfärbung, die ein ähnliches papierchromatographisches Verhalten zeigen wie die im Alkoholextrakt erhaltenen rot gefärbten Substanzen. Die angeführten Farbreaktionen sind also für den Nachweis der Flavandiole (Leuco-anthocyanidine) nicht spezifisch, da die Vanillin-Salzsäure-Reaktion auch von Catechinen, die Salzsäure-Isoamylalkohol-Reaktion auch von Piceatannol gegeben wird und der Nachweis lediglich bei chromatographischer Identifizierung der gebildeten Anthocyanidine eindeutig wäre. Für den Alkoholextrakt des Fichtenbastes kann auf Grund dieser Kriterien gesagt werden, daß er Leuco-anthocyanidine nicht enthält.

E Bestimmung der Verknüpfungsstelle der Glucose im Piceatannolmonoglucosid.

Um die Verknüpfungsstelle des Glucosemoleküls im Piceatannolmonoglucosid festzulegen, was auch für die Klärung der Biosynthese von Bedeutung sein kann, wurden zuerst die für die Strukturaufklärung des Diglucosids erfolgreich verwendeten Wege eingeschlagen(6).

(24) H. Endres, unveröffentlicht.

- 1.) Nach Markierung der freien, phenolischen Hydroxyle im Piceatannolmonoglucosidmolekül mit Dinitrophenylgruppen sollte der Zucker hydrolytisch abgespalten und die frei gewordene Hydroxylgruppe methyliert werden. Nach oxydativer Spaltung der Stilbendoppelbindung und Trennung der entstandenen Carbonsäuren müßte nach Identifizierung der isolierten Spaltprodukte eine Aussage über die Verknüpfungsstelle der Glucose möglich sein.

Aus dem Piceatannolmonoglucosid konnte durch Umsetzung mit Fluordinitrobenzol ein nicht kristallines, mit den berechneten Analysenwerten gut übereinstimmendes, Tetradinitrophenylmonoglucosid erhalten werden (vgl. III B 1 a), bei dem die im Glucosid freien phenolischen OH - Gruppen mit Dinitrophenylgruppen markiert waren. Der Zucker des in Wasser nahezu unlöslichen Produktes wurde in Eisessig mit Salzsäure hydrolytisch abgespalten. Aus den Analyseergebnissen des Aglucons geht hervor, daß nach der Hydrolyse nicht, wie erwartet, das Tetra-DNP-piceatannol erhalten wurde, sondern ein Tri-DNP-aglucon vorlag (vgl. III B 1 b). Es ist also ein Dinitrophenylrest abgespalten worden und im Filtrat des Tri-DNP-aglucons konnte auch Dinitrophenol papierchromatographisch nachgewiesen werden. Um die Säurehydrolyse zu umgehen wurde das Tetra-DNP-monoglucosid mit Pufferlösung und Glucosidaselösung geschüttelt, aber selbst nach 14-tägigem Stehen konnte kein enzymatisch abgespaltenen Zucker festgestellt werden.

- 2.) Beim nächsten, zur Lösung des Problems eingeschlagenen Weg wurden zuerst die freien, phenolischen OH-Gruppen mit Diazomethan in einer, mehrere Tage benötigenden Reaktion methyliert. Aus den Analysenwerten der amorphen Substanz geht hervor, daß es sich um das Piceatannol-tetramethoxymonoglucosid handelt (vgl. III B 2 a). Wegen der Unlöslichkeit dieser Verbindung in Wasser wurde wieder die Säurehydrolyse in einem Methanol-Wassergemisch angewendet. Das erwartete Tetramethoxyaglucon konnte jedoch nicht erhalten werden, sondern es entstand wieder -wie die Analysen-

werte ergaben- das Trimethoxyaglucon (vgl. III B 2 b).

Da also diese beiden, beim Diglucosid erfolgreichen Wege nicht zu verwertbaren Ergebnissen führten, wurden folgende, neue Schritte durchgeführt:

-) Um die Säurehydrolyse am Piceatannolmonoglucosidderivat zu umgehen, wurde ein aus einer Märzernte isoliertes Glucosid peracetyliert. Das weiße, kristallin erhaltene Acetylglucosid, dessen Analysenwerte mit denen für ein Octaacetoxy-piceatannol-monoglucosid berechneten gut übereinstimmten, konnte mit 95 %iger Ausbeute erhalten werden und zeigte nach mehrmaligem Umkristallisieren einen Schmelzpunkt von 148°C (vgl. III B 3 a). Die Spaltung des Moleküls erfolgte in neutraler Lösung mit Kaliumpermanganat. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden unter Luftausschluß mit Lauge entacetyliert und das Reaktionsgemisch -nach Ansäuern- ausgeäthert. Nach Auftrennung an einer Polyamidsäule wurde das auch beim Abbau des Piceatannols isolierte Trihydroxytetralin erhalten und durch Elementaranalyse, UV-Absorptionsspektrum und papierchromatographisch als solches identifiziert (vgl. III B 3 e).

Nach oxydativer Spaltung und Entacetylierung des kristallisierten Acetylglucosids lag also die Tetralinseite des Piceatannolmonoglucosides frei vor und konnte mit Äther ausgeschüttelt werden. Man müßte daher annehmen, daß das Glucosid der Protocatechusäure in der wässrigen Phase enthalten wäre. Aber weder nach Säurehydrolyse noch nach enzymatischer Zuckerabspaltung konnte Protocatechusäure in der wässrigen Phase nachgewiesen werden. Dieser Versuch bleibt unklar und kann nicht ganz gedeutet werden.

Interessanterweise konnten bei einem nicht kristallisierenden Acetylglucosid neben dem Trihydroxytetralin geringe Mengen an Protocatechusäure papierchromatographisch nachgewiesen werden.

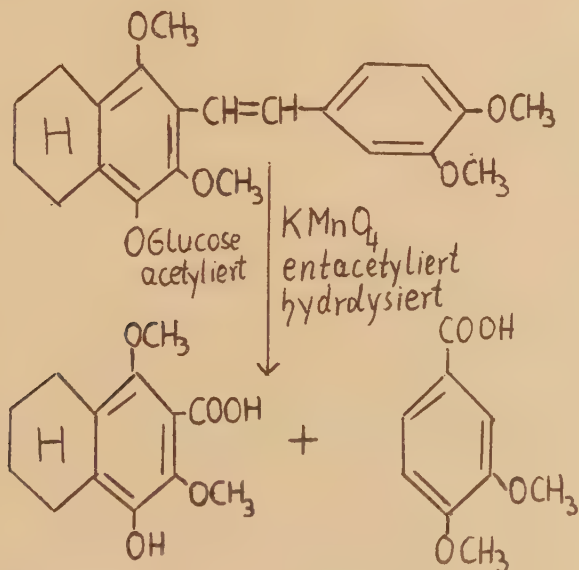
- 4.) Beim nächsten, eingeschlagenen Weg stellte ich ein gemischt substituiertes Piceatannolmonoglucosidderivat dar und die Glucose wurde wieder erst nach erfolgter oxydativer Spaltung und Entacetylierung säurehydrolytisch und enzymatisch abgespalten.

Die beim Tetramethoxy-monoglucosid (Glucosid aus einer Oktoberernte) frei vorliegenden Zuckerhydroxyle wurden acetyliert und das mit 90 %iger Ausbeute erhaltene Acetylderivat an der Stilbendoppelbindung mit Permanganat in neutraler Lösung gespalten (vgl. III B 4 b). der Braunstein wurde abfiltriert, mit Pyrosulfitlösung gelöst und nach schwachem Ansäuern konnte eine rein weiße, kristalline Substanz ausgeäthert werden. Es handelte sich um eine Carbonsäure, deren UV-Spektrum identisch mit dem der Veratrumsäure war. Nach Umkristallisation schmolz die Verbindung bei 174° . Der Mischschmelzpunkt mit synthetischer Veratrumsäure ergab keine Depression (vgl. III B 4 b). Die Ausbeute an Veratrumsäure betrug 69 % der Theorie. Der Zucker mußte also hier, im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch, an der Tetralinseite des Piceatannols gebunden sein.

Das nach Abfiltrieren des Braunsteins erhaltene Filtrat wurde mit Natronlauge unter Luftausschluß durch mehrtägiges Stehen in der Kälte entacetyliert und der glucosidisch gebundene Zucker enzymatisch und in einer anderen Probe auch säurehydrolytisch abgespalten. Nach Ausschütteln dieser beiden Proben mit Äther wurde eine Verbindung isoliert, die papierchromatographisch und UV-spektroskopisch mit dem von H. Endres (7) aus Trimethoxy-diacetoxy-piceatannol gewonnenen 4-Hydroxy-1,3-dimethoxy-5,6,7,8-tetrahydro-naphthalin-carbonsäure-(2) identisch war (vgl. III B 4 c).

In beiden Ätherauszügen konnte außerdem eine, in geringerer Menge vorhandene, mit diaz. Benzidin anfärbbare Substanz papierchromatographisch als Isovanillinsäure identifiziert werden.

Zusammenfassend kann aus dem letzten Versuch gesagt werden, daß der Zucker im Piceatannolmonoglucosid (Oktober-ernte) hauptsächlich an der Tetralinhälfte gebunden war. Hierfür spricht das Auffinden der Veratrumsäure und der Dimethoxy-hydroxy-tetralin-carbonsäure (vgl. folgendes Formelbild).



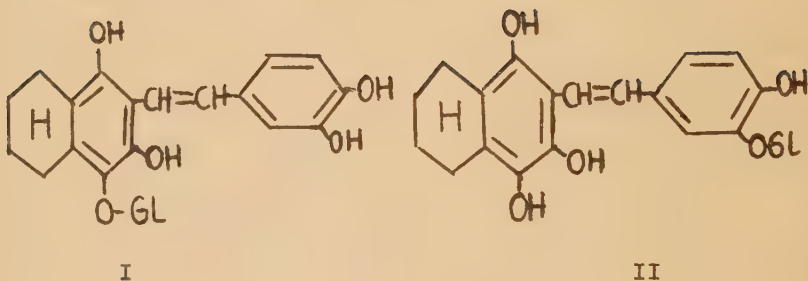
4-Hydroxy-1,3-dimethoxy-
5,6,7,8-tetrahydro-naph-
thalin-carbonsäure-(2)

Veratrumsäure

Der Nachweis von isovanillinsäure läßt jedoch auch auf das Vorkommen eines Monoglucosides, bei dem die Glucose in der 3'-Stellung des Piceatannols gebunden ist, schließen. Hierfür spricht auch das Auffinden des Trihydroxy-tetralins bei der Spaltung des peracetylierten Glucosids.

Es ist also anzunehmen, daß das kristalline Piceatannol-monoglucosid des Alkoholextraktes Mischkristalle zweier isomerer Glucoside darstellt, denen folgende Formeln zu-

zuschreiben sind:

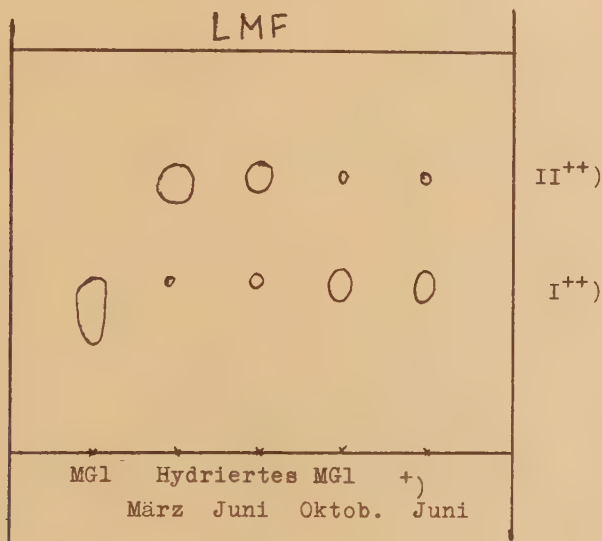


Bei mehreren Versuchen, den Versuch 3 zu wiederholen, konnte kein kristallines Acetylprodukt erhalten werden und es ist wohl als ein Zufall anzusprechen, daß es in dem beschriebenen Versuch gelang. Wie anschließend gezeigt wird, ist das Mengenverhältnis der beiden Isomeren zueinander sehr verschieden; dies kann sogar soweit gehen, daß manchmal, wie z. B. in Versuch 3, die Formel II überwiegt und manchmal, wie z. B. in Versuch 4, die Formel I. Das Acetylglucosid kristallisierte dann, wenn eine der beiden Komponenten nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist, wie es in Versuch 3 zufällig der Fall war.

Die unterschiedlichen Mengenverhältnisse der beiden Isomeren dürften jahreszeitlich bedingt sein; auch ein wechselndes Verhältnis von Pflanze zu Pflanze muß in Betracht gezogen werden.

Eine säulen- oder papierchromatographische Auftrennung der beiden Ficeatannolmonoglucoside ist bisher nicht gelungen. Jedoch kann das Gemisch nach katalytischer Hydrierung an der Stilbendoppelbindung, wobei die entsprechenden Dihydropiceatannolmonoglucoside entstehen, papierchromatographisch getrennt werden, ein Befund, den K. Merkle (5) bereits an einem aus Essigesterextrakt isolier-

ten, kristallinen Piceatannolmonoglucosid beschrieb.
Abb. 10 zeigt eine Reihe von Papierchromatogrammen hydrierter Piceatannolmonoglucoside, die aus Bast, der zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet worden war, isoliert wurden.



+) Versuch von K.Merkle (5).

Abb. 10; Papierchromatographische Untersuchung
kat. hydrierter Piceatannolmonoglucoside.
Aufgetr.: Piceatannolmonoglucosid (MGl),
hydriertes Piceatannolmonoglucosid aus
verschiedenen Ernten;
Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser
(4:1:5);
Laufzeit: 17 Stunden; aufsteigend chro-
matographiert;
Sprühreagens: 2 %ige Misenalalösung.

⁺⁺) Vgl. Formeln S. 38

III. Experimenteller Teil

A Untersuchung des Alkoholextraktes

1. Darstellung des alkohollöslichen Rohproduktes.

Der Bast wurde von einer etwa 40 jährigen, frisch gefällten Fichte mit geringem Verborkungsgrad nach der von Graßmann und Mitarbeiter (2) angegebenen Vorschrift gewonnen. Erntezeit: März 1957.

Trockengewicht des Bastes bei 80°: 35,7 %.

2,88 kg des feuchten, zerkleinerten Bastes (Trockengewicht: 1028 g) wurden in einen 10 l Rundkolben gegeben und unter ständigem Durchleiten von Kohlendioxyd, das zuvor eine Waschflasche mit Natriumpyrosulfitlösung passiert hatte, viermal je 5 Stunden mit Chloroform extrahiert. Dann war das Chloroform farblos und der Bast völlig entharzt. Zur Befreiung von anhaftendem Chloroform wurden die Bast-schnitzel im Exhaustor bei 45° getrocknet und dann in einer Schlagbolzenmühle fein gemahlen. Der fast weiße, wie Sägemehl aussehende Bast wurde wieder in den Extraktionskolben gebracht und unter Durchleiten von Kohlendioxyd (mit Spuren von Schwefeldioxyd) so oft mit Essigester ausgekocht, bis der Essigesterauszug keinen Gerbstoff mehr enthielt. Im ganzen wurde 9 mal extrahiert. Ausbeute: 133 g essigesterlösliches Glucosidgemisch mit einem Gerbstoffgehalt von 73 %.

Der sorgfältig getrocknete Bast wurde im 10 l Rundkolben mit absolutem Äthylalkohol vollkommen bedeckt und unter ständigem Durchleiten von Kohlendioxyd, das Spuren von Schwefeldioxyd enthielt, drei Stunden unter Rückfluß extrahiert. Der rotgelb gefärbte Extrakt wurde im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur bis 40°C eingedampft. Während

der Destillation wurde durch die Kapillare ständig Kohlendioxyd geleitet, um eine Oxydation möglichst auszuschließen. Ausbeute 43,5 g eines gelblichen und ziemlich voluminösen Produktes.

Diese Extraktionen mit absolutem Alkohol wurden so lange fortgesetzt, bis praktisch kein Rückstand mehr gewonnen werden konnte.

Tabelle 6

Ausbeuten bei den Alkoholextraktionen.

Verwendet wurden 1028 g trockner Bast, entsprechend 2880 g feuchtem Bast.

	Extraktionsdauer in Stunden	Ausbeute in g
1. Extraktion	3	43,5
2. " "	3	23,5
3. " "	3	14,0
4. " "	36	12,0
5. " "	36	8,0
6. " "	48	4,2

Ausbeute: $\overline{105,2}$ g, entspr.
10,21 % bezog.auf trock.Bast.

Von den ersten drei Alkoholfraktionen wurden Gerbstoffanalysen angefertigt. Dabei zeigte sich, daß sie überein-

stimmende Anteilzahlen aufwiesen. Die in Tabelle 7 zusammengestellten Analysenwerte stellen Mittelwerte dar. Die Gerbstoffanalysen wurden nach der Hautpulver-Halbmikro-Methode durchgeführt.

Tabelle 7

Gerbstoffanalysen der Alkoholextrakte.

	1.Alkohol- extrakt	2.Alkohol- extrakt	3.Alkohol- extrakt
Gesamt trockenrückstand	95,1 %	96,6 %	93,3 %
Gesamt lösliches	95,0 %	96,5 %	93,2 %
Wasser	4,9 %	3,4 %	6,7 %
Unlösliches	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Nichtgerbstoff	61,3 %	63,1 %	60,3 %
Gerbstoff	33,7 %	33,4 %	32,9 %
Anteilzahl	35,5	34,6	35,3

Die von den Extraktionsrückständen erhaltenen Analysenwerte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt (Mittelwerte).

Tabelle 8

Gerbstoffanalysen des nach Extraktion mit Essigester und anschließend mit Alkohol erhaltenen Fichtenbastes.

	Fichtenbast	Bast nach erschöpf.Extr. mit Essigester.	Bast nach erschöpf.Extr. mit Alkohol
Ges.trock.rückst.	32,2 %	26,0 %	16,5 %
Unlösliches	0,1 %	0,1 %	0,0 %
Gesamtlösliches	32,1 %	25,9 %	16,5 %
Gerbstoff	17,4 %	12,1 %	9,1 %
Nichtgerbstoff	14,7 %	13,8 %	7,4 %
Anteilzahl	54,2	46,7	55,1

2. Gerbstoffanreicherung durch Abtrennung der Nichtgerbstoffe an einer Polyamidsäule.

In eine am unteren Ende mit einer Glasfritte abgeschlossenen Säule wurde 2 - 3 Stunden in Wasser gequollenes Polyamidpulver (feinst, der Farbwerke Höchst, Werk Bobingen) portionsweise eingeschlämmt. Die Füllhöhe der Säule betrug 37 cm, der Durchmesser 6 cm.

15 g alkohollösliches Rohprodukt mit einem Gesamttrockenrückstand von 94 % und einem Gerbstoffgehalt von 33 % wur-

den in 15 ml Wasser gelöst und sorgfältig auf die Säule aufgetragen. Zur Entfernung der Nichtgerbstoffe wurde zuerst mit 16 l dest. Wasser gewaschen und anschließend mit 7 l reinem Methanol und 2 l Dimethylformamid eluiert. Durch die Elutionsmittel wurde zuerst ein kräftiger Strom von Kohlendioxyd mit Spuren von Schwefeldioxyd geleitet. Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt aufgefangen und im Vakuum unter CO_2/SO_2 Atmosphäre zur Trockne gebracht. Das wässrige Eluat ergab eine gelblich-weiße Masse von 8,4 g, das sind 56 % der Einwaage. Die Prüfung auf phenolische Substanzen mit 2 %iger Eisenalaunlösung war negativ. Mit Wasser wurden also 92 % des aufgetragenen Nichtgerbstoffes eluiert.

Ausbeute mit Methanol: 4,8 g eines voluminösen, gelblichen Rückstandes (32 % bezogen auf die Einwaage).

Ausbeute mit Dimethylformamid: 0,4 g entsprechend 2,7 % der Einwaage.

Insgesamt wurden 13,6 g = 90,7 % der Einwaage eluiert. Nachdem papierchromatographisch gezeigt werden konnte, daß die Methanol- und Dimethylformamidfraktion die gleichen Komponenten enthielten, wurden sie vereinigt.

Aus dem Ergebnis der Gerbstoffanalyse des gereinigten Gerbstoffs (Tab. 9) geht hervor, daß mit reinem Methanol 62 % und mit Dimethylformamid nochmals 7 % des aufgetragenen Gesamtgerbstoffs eluiert werden konnte.

a) Untersuchung des mit Wasser von der Säule eluierten Nichtgerbstoffs.

Identifizierung und quantitative Bestimmung der Zucker:

Eine 35 mg enthaltende Nichtgerbstofflösung wurde mit basischer Bleiacetatlösung versetzt, filtriert und mit Kaliumsulfatlösung die überschüssigen Bleiionen entfernt. Nach erneuter Filtration wurde die klare Lösung auf 100 ml aufgefüllt und für jede Bestimmung 2 ml (0,7 mg Nichtgerb-

Tabelle 9

Gerbstoffanalysen des an Polyamid
gereinigten Glucosidgemisches.

Versuch-Nr.	1	2	3
Gesamtlösliches	77,3 %	77,6 %	76,9 %
Unlösliches	22,7 %	22,4 %	23,1 %
Gerbstoff	64,4 %	64,2 %	64,6 %
Nichtgerbstoff	12,9 %	13,4 %	12,3 %
Anteilzahl	83,3	82,7	84,0

stoff) entnommen. Die Zuckerbestimmungen nach Hagedorn-Jensen (14) ergaben gut übereinstimmende Werte und zwar enthielten 0,7 mg Nichtgerbstoff 0,194 mg reduzierenden Zucker, das sind 27,7 % freier Zucker, berechnet als Glucose.

Für die papierchromatographische Untersuchung der frei vorliegenden Zucker wurde die auf den 10. Teil eingedampfte Nichtgerbstofflösung zusammen mit Vergleichssubstanzen aufgetragen und mit dem Lösungsmittel n-Butanol: Eisessig:Wasser (4:1:5), obere Phase, 20 Stunden aufsteigend chromatographiert. Angefärbt wurde mit Anilinphthalatlösung (25). Die Hauptmenge bestand aus Glucose; daneben war noch Fruktose und ein Oligosaccharid nachzuweisen.

Für die Bestimmung des im Nichtgerbstoffgemisch vorliegenden Gesamtzuckers wurde zur enzymatischen Spaltung das Glucosidasegemisch aus dem Schimmelpilz "Aspergillus orycae", das im Luitaseextrakt der Firma "Luitpold-Werke München" enthalten ist, verwendet. Vor der Benützung wurde das Enzymmaterial erst 7 Tage lang in einem Naturindarm gegen Leitungswasser, hierauf 3 Tage lang gegen dest. Wasser dialysiert und dadurch von Balaststoffen weitgehend befreit. Durch Eindampfen in Silbertiegeln wurde das Trockengewicht bestimmt.

Zu 10 ml der Nichtgerbstofflösung (35 mg Nichtgerbstoff) wurde 0,4 ml eines n/20 Acetatpuffers von pH = 5,2 (n/20 Essigsäure:n/20 Natriumacetat 1:4) gegeben und nach Zusatz von 0,2 ml Luitase (3,1 mg Trockengewicht) mit wenig Wasser in ein 50 ml Kölbchen gespült. Dieses wurde verschlossen in einen Thermostaten eingebracht und 38 Stunden bei 34° C dort belassen. Anschließend wurde durch Versetzen mit 5 %iger basischer Bleiacetatlösung die Enzymreaktion unterbrochen und nach Filtration die überschüssigen Bleionen mit 10 %iger Kaliumsulfatlösung entfernt. Die klare Lösung wurde im Meßkölbchen auf 150 ml aufgefüllt und je 3 ml (0,700 mg Nichtgerbstoff) für die einzelnen Bestimmungen nach Hagedorn-Jensen (14) verwendet. 3 ml enthielten 0,308 mg reduzierenden Zucker; das ergibt -berechnet als Glucose- einen Gesamtzucker von 44 % im Nichtgerbstoffgemisch.

Die Untersuchung des Nichtgerbstoffs auf Pungenin (4-Hydroxy-3-glucosido-acetophenon) erfolgte papierchromatographisch mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5). Besprüht wurde mit 2 %iger 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung, die mit Pungenin eine Orangefärbung gibt. Pungenin war nicht nachzuweisen, auch nicht im rohen Alkoholextrakt.

b) Zerlegung des gereinigten Gerbstoffgemisches in einen wasserlöslichen- und wasserunlöslichen Anteil.

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, enthält das gereinigte Gerbstoffgemisch ca. 22 % wasserunlösliche Verbindungen. Um diese zu entfernen wurden 4,5 g des eluierten Produktes mit 200 ml Wasser, durch das vorher Kohlendioxyd geleitet wurde, auf etwa 40° erwärmt und nach dem Abkühlen filtriert. Nach mehrmaligem Nachwaschen wurde die klare Lösung im Vakuum (unter CO₂) bei 40° Badtemperatur eingedampft. Die Ausbeute an glasiger, gelbbrauner Substanz betrug 3,45 g = 76,6 % bezogen auf Einwaage.

Das Filter mit dem wasserunlöslichen Rückstand wurde im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausbeute: 0,9 g = 20 %.

c) Untersuchung des wasserunlöslichen Anteils auf saure Verbindungen.

160 mg Unlösliches wurde in eine sorgfältig gereinigte und getrocknete Glasfritte eingewogen und mit 2n NaOH behandelt, welche sich hierbei schwarzbraun färbte. Es wurde so lange NaOH zugegeben und abgesaugt, bis diese farblos blieb. Der nicht in Lösung gegangene Anteil wurde mehrmals, bis zur neutralen Reaktion, mit dest. Wasser nachgewaschen und nach dem Trocknen die Glasfritte zurückgewogen. Von den eingewogenen 160 mg waren 92,8 mg ungelöst zurückgeblieben; es sind also 67,2 mg = 42 % in Lösung gegangen.

Bei der Wiederholung obigen Versuches wurden 171,4 mg Wasserunlösliches eingewogen. Davon blieben nach der Behandlung mit 2n-NaOH 97,9 mg zurück. 73,5 mg das sind 42,9% gingen in Lösung, zeigen also sauren Charakter. Der Gehalt an sauren Verbindungen im Wasserunlöslichen betrug 42,5 %.

3. Untersuchung des gereinigten wasserlöslichen Gerbstoffgemisches.

a) Eigenschaften und Klassifikation des Gerbstoffes.

1. Gelatineprobe: Starke Trübung.
2. Mit Eisenalaunlösung entsteht eine rotbraune Färbung, die schnell nach olivgrün umschlägt. Beim Verdünnen mit Leitungswasser bzw. mit schwacher Sodalösung wechselt die Farbe über rotviolett nach blau. Dadurch können noch geringe Mengen an Gerbstoff nachgewiesen werden.
3. Bromwasserreaktion: Rotgelbe Färbung.
4. Formaldehyd-Salzsäureprobe: Beim Erhitzen der wässrigen Gerbstofflösung mit Formaldehyd und Salzsäure fällt ein gelbbrauner Niederschlag aus. Im Filtrat können keine phenolischen Substanzen mehr nachgewiesen werden.
5. Essigsäure-Bleiacetatreaktion: Der mit neutralem Bleiacetat gebildete gelbliche Niederschlag löst sich bei Zugabe von verdünnter Essigsäure wieder auf. Der Niederschlag erscheint wieder beim Versetzen der sauren Lösung mit basischem Bleiacetat.

Die Ergebnisse der Gerbstoffreaktionen deuten auf einen Gerbstoff mit Pyrocatechincharakter, während Pyrogallolgerbstoffe eindeutig nicht nachgewiesen werden konnten.

Papierchromatogr. Untersuchung des Gerbstoffgemisches:

Für die papierchromatographischen Trennungen wurden die Lösungsmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5, obere Phase) und Äthanol:Wasser (1:3) verwendet. Es wurde immer aufsteigend chromatographiert.

Darstellung des zum Besprühen verwendeten diazotierten Benzidins: 0,5 g Natriumnitrit wurde in 25 ml Wasser gelöst. Dazu wurden 0,3 g Benzidin und 5 ml 2n-HCl gegeben und nach etwa 15 minütigem Schütteln vom Ungelösten abfiltriert. Die entstandene gelbliche Lösung von diaz. Benzidin ist

nur einige Stunden haltbar.

Darstellung von Vanillin-Salzsäure-Reagens: 1 g Vanillin wird in 12 ml Methanol gelöst und vor der Benützung 2 Teile dieser Lösung mit 1 Teil 25 %iger HCl versetzt. Das Reagens ist in der Kälte einige Tage haltbar.

b) Bestimmung des gebundenen Zuckers im Gerbstoffgemisch.

Das verwendete Glucosidgemisch bestand nicht nur aus Gerbstoff allein, sondern wies eine Anteilzahl von 76 auf. Zur Bestimmung des gebundenen Zuckers wird deshalb die Kenntnis des freien und des Gesamtzuckers nötig.

Von einer Lösung, die in 100 ml 193 mg des Gerbstoffgemisches enthielt (Lösung a), wurden 30 ml (57,9 mg) in ein Becherglas pipettiert und mit einer Lösung von basischem Bleiacetat versetzt. Nach Filtrieren und Entfernen der überschüssigen Bleiionen mit 10 %iger Kaliumsulfatlösung wurde die erneut klar filtrierte Lösung auf 50 ml aufgefüllt (Lösung b). Für die Bestimmung der reduzierenden Zucker nach Hagedorn-Jensen (14) wurden Proben zu je 5 ml (enthielten 5,8 mg Gerbstoff mit A.Z. = 76) entnommen. Die gut übereinstimmenden Werte ergaben einen Gehalt an freiem Zucker von 0,7 %, berechnet als Glucose.

Von Lösung b wurden 30 ml (34,7 mg) mit 0,22 ml Luitase (1,62 mg Trockengewicht) und 0,21 ml n/20 Acetatpuffer versetzt und -in einem Kolben verschlossen- 40 Stunden im Brutschrank bei 39° belassen. Durch Ausfällen der Enzyme mit basischem Bleiacetat wurde die Enzymreaktion unterbrochen. Es wurde filtriert, die überschüssigen Bleiionen mit Kaliumsulfat entfernt und nach erneutem Filtrieren auf 100 ml aufgefüllt. Für die Bestimmung nach Hagedorn-Jensen wurden Proben von 20 ml (6,94 mg) und 10 ml entnommen. Der Mittelwert ergab einen Gehalt an Gesamtzucker im entgerbten Glucosidgemisch mit A.Z. = 76 von 1,8 %, bezogen auf die Einwaage.

Zur Bestimmung des Gesamtzuckers im Gerbstoff wurden 20 ml der Lösung a (38,6 mg) mit 0,97 ml Luitase (7,36 mg Trockengewicht) und mit 0,95 ml n/20 Acetatpuffer versetzt und mit etwas Wasser in ein 50 ml Kölbchen gespült. Dieses wurde in den Brutschrank gegeben und 30 Stunden bei 39° dort belassen. Nach Auffüllen auf 50 ml wurden 15 ml (11,58 mg) entnommen, in der oben beschriebenen Weise die Gerbstoffe und Enzyme gefällt und auf 50 ml aufgefüllt. Für die Bestimmungen nach Hagedorn-Jensen (14) wurden je 5 ml, das sind 1,158 mg, entnommen. Diese enthielten 0,247 mg Zucker. Der Gesamtzucker im Gerbstoffgemisch mit der Anteilzahl = 76 beträgt also 21,3 %, berechnet als Glucose. Der gebundene Zucker im reinen Gerbstoffgemisch ergibt sich aus der Differenz (21,3 % - 1,8) zu 19,5 %.

Papierchromatographische Identifizierung des gebundenen Zuckers: Als Ausgangslösung dieser Bestimmung wurde die, nach dem Luitaseabbau durch mehrmaliges Ausschütteln der Aglucone mit Essigester zurückbleibende und durch die Enzymlösung dunkelbraun gefärbte, wässrige Phase verwendet, wie sie bei der Gewinnung des Aglucongemesches anfällt (vgl. III A 5). Diese wurde stark eingengt und von den ausgefallenen dunkelbraunen Flocken abfiltriert. Der Zucker wurde unter Zuhilfenahme mitlaufender Vergleichssubstanzen (Glucose, Arabinose, Rhamnose) mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Pyridin:Wasser (3:2:1,5) 15 Stunden aufsteigend chromatographiert. Angefärbt wurde mit Anilinphthalatlösung (25). Es konnte nur Glucose (Rf-Wert: 0,36) nachgewiesen werden.

4. Verteilungschromatographie des Glucosidgemisches an einer Kieselgel-Zellulosesäule.

Das Glucosidgemisch wurde an einer Kieselgel-Zellulosesäule mit einem Gemisch aus Wasser-Methanol-n-Butanol-Petroläther (Sdp. 50-60°) (8:5:8:6) chromatographiert. Durch die

verwendete obere Phase wurde zur Verhinderung der Oxydation ein kräftiger Strom Kohlendioxyd mit Spuren von Schwefeldioxyd durchgeleitet.

Zur Entfernung der Schwermetallverunreinigungen im Kieselgel (Malinckrodt) wurden 25 g in Methanol suspendiert und eine Lösung von 100 mg 8-Oxychinolin in 5 ml Methanol zugegeben und innig verrührt. Nach 3 Stunden wurde abgesaugt und mehrmals mit Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Kieselgel mit Zellulose Muster III (Waldhof-Mannheim) im Verhältnis 1:1 innig gemischt und langsam unter stetem Umrühren das Lösungsmittelgemisch zugegeben. Die Suspension wurde zur Entfernung der eingeschlossenen Luft unter häufigem Umrühren 6 Stunden stehen gelassen und dann eine Chromatographiesäule portionsweise gleichmäßig gefüllt. Füllhöhe: 45 cm, Durchmesser: 1,6 cm. Die Säule wurde so lange mit dem Lösungsmittelgemisch gewaschen, bis es farblos war.

Gewinnung der Glucosidfraktionen: Nach Lösen von 69 mg des Glucosidgemisches in 2 ml des zur Elution verwendeten Lösungsmittels und Abfiltrieren von 5 mg Unlöslichen wurde die Lösung sorgfältig auf die Säule gebracht und eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 2 ml pro Stunde. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml gesammelt und je 1 ml mit Hilfe der Nitritreaktion nach Vorsatz-Batzer (26) getestet. Wie aus Abb. 11 ersichtlich ist, wurden 4 Fraktionen erhalten, wobei die vierte Fraktion die anderen mengenmäßig weit überwiegt.

Papierchromatographische Untersuchung der erhaltenen Fraktionen: Anhand der Elutionskurve wurden die Fraktionen zussammengefaßt und papierchromatographisch mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:2,5) untersucht.

(26) F.Vorsatz, Coll. (Darmstadt) 424, (1942), vgl.

H.Batzer, Das Leder 2, 169 (1951).

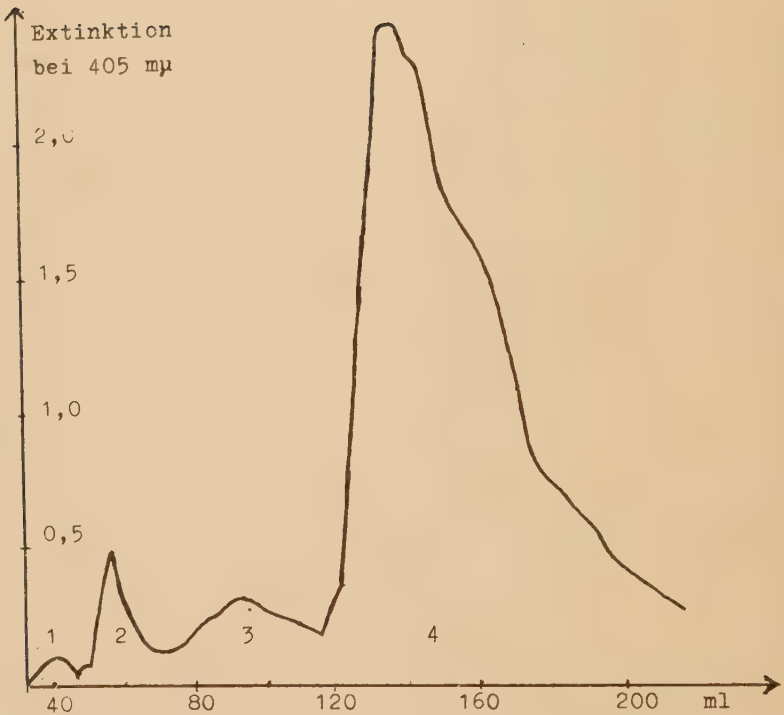


Abb.11; Verteilungschromatographie des alkoholextrahierten Glucosidgemisches an einer Kieselgel-Zellulose-Säule.

Lösungsmittel: Wasser:Methanol:n-Butanol:Petroläther (8:5:8:6).

Kolorimetrische Bestimmung nach Vorsatz-Batzer (26) bei 405 mμ.

Nach Besprühen mit Molybdänsalzlösung und Einhängen des Chromatogramms in einen mit Ammoniakdampf gefüllten Zylinder war zu ersehen, daß nur eine teilweise Fraktionierung auftrat und keine Komponente rein erhalten werden konnte.

5. Präparative Darstellung des Aglucongemisches und papierchromatographische Untersuchung.

2,5 g gereinigter wasserlöslicher Gerbstoff wurden in 53 ml n/20 Acetatpuffer gelöst. Nach Versetzen mit 23 ml dialysierter Enzymlösung (235 mg Luitasetrockengewicht) wurde mit Wasser in einem Kolben auf 400 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde 39 Stunden bei 32° im Brutschrank gehalten. Anschließend wurde im Vakuum unter Kohlendioxydatmosphäre bei einer Badtemperatur bis 40° auf ein Volumen von ungefähr 20 ml eingeengt und nach Abkühlen 7 mal mit zusammen 600 ml Essigester ausgeschüttelt. Der Essigester wurde mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und unter den üblichen Bedingungen zur Trockne gebracht.

Ausbeute an voluminösem, gelblichen Rückstand 1,31 g; dies entspricht 82 % der theoret. Ausbeute von 1,61 g (bei 2,5 g Glucosidgemisch mit 80 % Gerbstoff und 19,5 % gebundenem Zucker).

Die papierchromatographische Untersuchung des Aglucongemisches (Abb. 3) erfolgte mit den Lösungsmitteln n-Butanol: Eisessig:Wasser (4:1:5) und Äthanol:Wasser (1:3). Es wurde aufsteigend chromatographiert. Nach Betrachtung im UV-Licht wurde einmal mit diaz. Benzidin und einmal mit 2 %iger Eisenalaunlösung besprüht. Die Rf-Werte der einzelnen Flecken, Verhalten im UV-Licht und Anfärbbarkeit sind in Tab. 5 zusammengestellt.

6. Präparative Verteilungschromatographie des Aglucongemisches an Polyamid.

Polyamidpulver wurde -wie auf Seite 43 beschrieben- in eine Säule von 2,5 cm Durchmesser gegeben. Die Füllhöhe betrug 35 cm. 750 mg des rohen Aglucongemisches wurden in 7,5 ml Wasser-Methanol (1:2) gelöst und vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 500 ml Wasser, 800 ml Wasser-

Methanol (3:1), 300 ml Wasser-Methanol (2:1) eluiert. Beim Bestrahlen der Säule mit UV-Licht waren jetzt mehrere, deutlich von einander abgesetzte, blau fluoreszierende Banden zu erkennen. Ab jetzt wurden Fraktionen von 8 ml aufgefangen und je 0,8 ml zum Testen verwendet. Eluiert wurde mit 300 ml Wasser-Methanol (2:1), 2200 ml Wasser-Methanol (1:1), 2000 ml Wasser-Methanol (3:7) und 2060 ml reinem Methanol. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 40 ml pro Stunde. Zum Testen wurde die auf Phenole modifizierte Reaktion nach Vorsatz-Batzer (26) verwendet. Die Extinktionen wurden am "Medeor-Gerät" (Hamburg-Eppendorf) mit dem Filter 405 m μ gegen den Blindwert des reinen, aber durch die Säule gegangenen Lösungsmittels gemessen. Die Ergebnisse dieser Messung sind aus Abb. 4a zu ersehen. Anhand der gezeichneten Elutionskurve (Abb. 4a) wurden die einzelnen Komponenten zusammengefaßt und im Vakuum das Lösungsmittel unter Kohlendioxyd bei möglichst niedriger Badtemperatur eingedampft. Dabei fiel bei den mit Wasser-Methanolgemischen eluierten Fraktionen A₂, A₃ und A₄ nach Entfernung des Methanols ein weißlicher Niederschlag aus. Beim Eindampfen blieb bei den einzelnen Fraktionen ein, in seinen Farben von hell- bis braungelb wechselnder Rückstand zurück. Nach Verwerfen kleinerer Zwischenfraktionen betrug die gravimetrisch bestimmte Gesamtausbeute 594 mg, das sind 79,2 % der Einwaage.

Die Ausbeute auf die einzelnen Fraktionen verteilt ergibt sich aus Tab. 10 (Seite 55).

7. Untersuchung der erhaltenen Agluconfraktionen.

Papierchromatographische Reinheitsprüfung.

Die erhaltenen Agluconfraktionen wurden papierchromatographisch mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) untersucht. Es wurde aufsteigend chromatographiert und nach Betrachtung im UV-Licht durch Besprühen mit 2%iger

Tabelle 10

Ausbeute der einzelnen, durch Trennung an
Polyamid erhaltenen Agluconfraktionen.

Fraktion	Ausbeute	
	in mg	in % ⁺)
A ₁	8	1,1
A ₂	165	22,0
A ₃	19	2,5
A ₄	374	49,9
A ₅	13	1,7
A ₆	15	2,0

⁺) bezogen auf das eingesetzte Material

Eisenalaunlösung angefärbt.

A₁: Die Hauptkomponente der unrein angefallenen Fraktion zeigt keine Fluoreszenz und gibt mit Fe^{III}-Lösung einen rosa gefärbten Fleck mit einem Rf-Wert = 0,90;

A₂: besteht hauptsächlich aus 2 blauviolett fluoreszierenden, mit Fe^{III} grau-grün färbenden Komponenten mit Rf-Werten von 0,38 und 0,73;

A₃: Hauptkomponente zeigt keine Fluoreszenz und färbt grau-grün; Rf-Wert = 0,81;

A₄: nur gering verunreinigt; stark blauviolette Fluoreszenz; gibt mit Fe^{III} eine Rosafärbung, die schnell nach grau-grün umschlägt. Rf-Wert = 0,72;

A₅: stark verunreinigt; blauviolette Fluoreszenz, grau-grüne Färbung. Rf-Wert = 0,82;

A₆: chromatographisch rein; blauviolette Fluoreszenz; färbt mit Fe^{III} grün; R_f-Wert = 0,91.

Aufnahme der UV-Absorptionsspektren.

Die unreinen Agluconfraktionen wurden auf ein Chromatogramm aufgetragen und -wie oben beschrieben- papierchromatographisch aufgetrennt. Die einzelnen Flecken wurden ausgeschnitten, die Aglucone mit abs. Äthylalkohol herausgelöst und die UV-Spektren aufgenommen (Abb. 7a und 7b).

Untersuchung der Agluconfraktion A₁.

Auf Grund des Verhaltens an Polyamid, der R_f-Werte in den Lösungsmitteln n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Äthanol:Wasser (1:3), der fehlenden UV-Fluoreszenz und der Farbreaktion mit Eisenalaun darf man annehmen, daß Agluconfraktion A₁ mit der früher im Essigesterextrakt aufgefundenen Agluconfraktion H identisch ist.

Untersuchung der Agluconfraktion A₂.

62 mg der aus 2 Komponenten bestehenden Fraktion A₂ wurden erneut -wie beschrieben- auf eine Polyamidsäule gegeben und mit Wasser-Methanolgemischen eluiert. Das Auslaufchromatogramm enthielt lediglich ein Maximum und das Papierchromatogramm wieder 2 Flecken, es ist also keine Trennung der beiden Aglucone erfolgt.

Zur papierchromatographischen Reinigung wurden 30 mg A₂ als Strich aufgetragen und 20 Stunden mit dem Lösungsmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) aufsteigend chromatographiert. Der Bogen wurde im heizbaren vakuumexsikkator bei 25° getrocknet, die beiden fluoreszierenden Streifen ausgeschnitten und mit Methanol eluiert. Da, wie die chromatographische Untersuchung der beiden stark eingeeengten Eluate zeigte, keine Auftrennung erhalten werden konnte, wurden beide Eluate erneut als Strich aufgetragen und chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden jeweils die beiden Streifen nach der UV-Fluoreszenz herausgeschnitten,

mit Methanol eluiert, im Vakuum eingeengt und die vier erhaltenen Eluate papierchromatographisch untersucht. Wie sich zeigte, konnten selbst nach zweimaliger papierchromatographischer Trennung die beiden Aglucone nicht rein erhalten werden.

Identifizierung der Agluconfraktion A₃.

Das UV-Spektrum von A₃ ist mit demjenigen des Dihydropiceatannols identisch (Abb. 7b). Da auch die R_f-Werte beider Substanzen in den Lösungsmitteln n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) und Alkohol:Wasser (1:3), das Verhalten an Polyamid, die fehlende UV-Fluoreszenz und die Färbung mit Eisenalaun übereinstimmen, kann A₃ als Dihydropiceatannol angesprochen werden.

Identifizierung der Agluconfraktion A₄.

A₄ wurde in heißem Wasser gelöst und bildete beim Abkühlen wetzsteinförmige, farblose Kristalle, die sich beim langsamen Verdunsten der Flüssigkeit sternförmig zusammenlagerten. Nach Trocknen im Vakuum schmolzen die Kristalle bei 215° unter Zersetzung.

Zum papierchromatographischen Vergleich von A₄ mit Piceatannol wurden jeweils die beiden Substanzen aufgetragen und aufsteigend chromatographiert. Angefärbt wurde durch Besprühen mit 2 %iger Eisenalaunlösung. Die in den angegebenen Lösungsmitteln identischen R_f-Werte waren:

R_f-Wert = 0,82 in sec. Butanol (wassergesättigt);

R_f-Wert = 0,06 in 2 %iger Essigsäure;

R_f-Wert = 0,72 in n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5).

Darstellung des Acetylderivates von A₄:

24,4 mg A₄ wurden in 10 ml Essigsäureanhydrid gelöst und 10 ml Pyridin zugegeben. Es wurde über Nacht stehen gelassen und anschließend 30 Minuten am Rückfluß unter Durchleiten von Stickstoff gekocht. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels bei niedriger Temperatur im Vakuum wurde der Rückstand im Vakuumexsikkator getrocknet.

Nach Aufnehmen in heißem Methanol wurde heiß filtriert. Beim Abkühlen bildeten sich weiße Nadeln, die nach der Umkristallisation einen Schmelzpunkt von 124° aufwiesen. Der Mischschmelzpunkt mit dem bei 124° schmelzendem Pentaacetylderivat des Piceatannols zeigte keine Depression.

Untersuchung der Agluconfraktion A₆.

Die Fraktion A₆ zeigte in folgenden Lösungsmitteln nur einen Fleck und kann daher als weitgehend rein bezeichnet werden:

- 1.) n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)
- 2.) 2 %ige Essigsäure
- 3.) sec. Butanol-wassergesättigt.

Das von der gelbbraunen, amorphen Substanz aufgenommene IR-Spektrum (Abb. 5) stimmt ziemlich mit dem IR-Spektrum des Piceatannols (Abb. 6) überein. Weitere Untersuchungen wurden jedoch wegen der geringen Menge nicht durchgeführt.

8. Direktkristallisation und Untersuchung der Hauptkomponente des Glucosidgemisches.

a) Fällung des Glucosids durch Animofen.

1,35 g des Glucosidgemisches mit einer Anteilzahl von 80 (Gerbstoff = 74 %) wurden in 0,5 ml Wasser durch kurzes Erhitzen in Lösung gebracht und mit einigen Kristallen von Glucosid E angeimpft. Bereits nach 2 Stunden hatten sich so viele Kristalle abgeschieden, daß die Lösung eine feste, weiße Paste darstellte. Es wurde mit wenig eiskaltem Wasser verrührt damit der nichtkristallisierende Anteil dünnflüssiger wird und in der Kältezentrifuge bei 0° C abzentrifugiert.

Ausbeute: 430 mg, das sind 44 % des Glucosidgemisches. Durch Animpfen der im Vakuum eingeeengten Mutterlauge wurden nochmals 110 mg, das sind 12% gewonnen, so daß die

Gesamtausbeute bei der Direktfällung 56 % betrug. Die weißen, wetzsteinförmigen Kristalle schmolzen bei 218° unter Zersetzung.

Nach Umkristallisation aus heißem Wasser betrug die Ausbeute 351 mg an rein weißen Kristallen mit Fp. = 226° C.

Die erhaltenen Analysenwerte stimmen auf ein Monoglucosid des Piceatannols bei Annahme von 1 Mol Kristallwasser:

$C_{24}H_{28}O_{10}, H_2O$	Ber.	C	58,32	H	6,07	O	35,63
MG. 494,24	Gef.	C	58,65	H	5,75		35,60

b) Identifizierung des aus dem krist. Glucosid gewonnenen Aglucons.

96 mg kristallisiertes Glucosid wurden in der beschriebenen Weise (vgl. III A 5) mit Luitase gespalten und das Aglucon durch Ausschütteln mit Essigester isoliert. Die Ausbeute an dem gelblichweißen, kristallinen Aglucon betrug 52 mg, das sind 85 % der Theorie.

Das gewonnene Aglucon wurde papierchromatographisch -wie auf Seite 57 beschrieben- als Piceatannol identifiziert.

c) Aufnahme des UV-Spektrums und der durch Chelatbildung bedingten Verschiebung.

0,24 mg Glucosid (0,00005 molare Lösung) wurden in 10 ml abs. Äthylalkohol gelöst. 4 ml dieser Lösung wurden einmal zur Messung in Alkohol mit 5 ml reinem Alkohol und zur Messung in Aluminiumchloridlösung mit 3 ml Alkohol und 2 ml einer 0,01 molaren, alkoholischen Aluminiumchloridlösung verdünnt. Zur Beschleunigung der Chelatbildung wurde eine Spatelspitze wasserfreies Natriumacetat zugegeben.

Aus Abb. 9 geht hervor, daß das Maximum von 327 m μ nach 346 m μ und das Minimum von 265 m μ nach 275 m μ verschoben wurde.

d) Bestimmung des gebundenen Zuckers.

32,6 mg kristallisiertes Glucosid wurden in 1,08 ml n/20 Acetatpuffer gelöst, 0,66 ml Luitase zugegeben (Trockengewicht = 12,6 mg pro ml) und auf 50 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden ebenfalls 1,08 ml Acetatpuffer und 0,66 ml Luitase auf 50 ml aufgefüllt. Die Kölbchen wurden in den Brutschrank (Temp. 39° C) gegeben und nach verschiedenen Zeiten immer bestimmte Mengen (Tab. 11) entnommen. Durch Zusatz von bas. Bleiacetatlösung wurde die Enzymreaktion gestoppt und das Aglucon gefällt. Nach Filtration wurden die Bleiionen mit 10 %iger Kaliumsulfatlösung gefällt, erneut filtriert, in Meßkölbchen aufgefüllt und immer 1/5 zur Bestimmung des Glucosegehaltes nach der Osazonmethode (20) colorimetriert.

Aus zweimal umkristallisiertem Glucosid wurde in einer Parallelbestimmung ein Glucosegehalt von 38,2 % bei enzymatischer Abspaltung gefunden (colorimetrische Bestimmung mit Phenylhydrazin).

Bei Abspaltung durch salzsaure Hydrolyse in 1n-HCl (Hydrolysendauer 6 Stunden) wurde nach der Osazonmethode 36,3 % Glucose gefunden. Mit 0,07n-HCl betrug der abgespaltene Zucker 36,9 % (Hydrolysendauer 10 Stunden).

e) Vergleich des durch Direktfällung aus dem Alkoholextrakt gewonnenen Piceatannolmonoglucosids mit dem aus dem Essigesterextrakt gewonnenen krist. Glucosid.

Papierchromatographisch zeigte das durch Fällung aus dem Alkoholextrakt gewonnene Glucosid und das aus Essigesterextrakt isolierte Piceatannolglucosid in allen verwendeten Lösungsmitteln -Äthanol:Wasser (1:3), 2 %ige Essigsäure, Methanol:Wasser (1:1), n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)- ein identisches Verhalten. Da beide Substanzen auch auf der Polyamidsäule mit verschiedenen Lösungsmitteln übereinstimmende Rf-Werte zeigten (Versuchsaus-

Tabelle 11

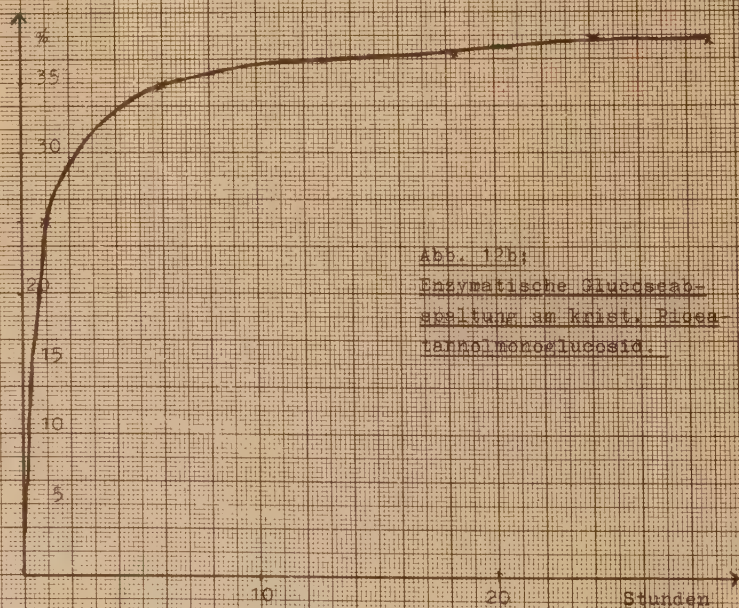
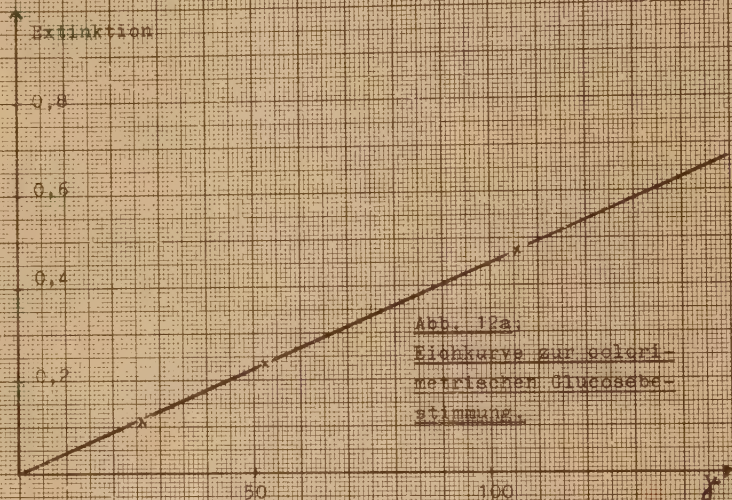
Enzymatische Zuckerabspaltung am krist.

Piceatannolglucosid (vgl. Abb. 12a u. 12b).

Zeit in Stunden	Aus 50 ml(32,6mg Glucosid)entnommene Menge in ml; (1/5 davon zur Be- stimmung verwendet)	Extinktion	abgespaltener Zucker in % (Blindwert ab- gezogen)
1	1,9	0,30	25,0
6	1,9	0,41	35,0
18 1/2	1,9	0,43	36,9
24 1/4	2,0	0,47	38,1
29	2,0	0,46	37,8
Blind- probe 29	1/50 der einge- setzten Menge	0,06	2,1

führung M. Oppelt), wurde an dieser Verbindung der Zucker- nach der auf Seite 60 beschriebenen Osazonmethode- bestimmt. Der gebundene Zucker betrug 39,4 % (Mittelwert). Es handelte sich also um ein Monoglucosid, und das aus Essigesterextrakt isolierte Piceatannolglucosid ist identisch mit dem aus Alkoholextrakt isolierten Monoglucosid.

Um das Ergebnis zu erhärten, wurde das UV-Spektrum und die durch Chelatbildung bedingte Verschiebung gemessen (vgl. Seite 59). Wie erwartet, wurde vor und nach der Verschiebung



ein völlig übereinstimmender Kurvenverlauf festgestellt.

B Bestimmung der Verknüpfungsstelle der
Glucose im Piceatannolmonoglucosid.

1. Abbau des Tetra-DNP-monoglucosids.

a) Darstellung des Tetra-DNP-monoglucosids.

600 mg Monoglucosid wurden in 18 ml Wasser gelöst und die Lösung mit 130 ml einer alkoholischen Lösung von 1,55 g Dinitrofluorbenzol und 25 ml einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung versetzt. Es wurde 4 Stunden bei 40° C geschüttelt und dann abgesaugt. Der Niederschlag wurde mit 10 %iger Essigsäure gründlich gewaschen. Um den Niederschlag von Dinitrophenol zu befreien, wurde er mehrere Male mit Äthanol und einige Male mit Äther gewaschen. Das gelbe, amorphe DNP-glucosid wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,23 g = 87 % der Theorie.

Aus der Analyse geht hervor, daß es sich um das Tetra-DNP-monoglucosid handelt.

$C_{48}H_{36}O_{26}N_8$	Ber.	C	50,53	H	3,18	N	9,83
MG: 1140,83	Gef.	C	50,49	H	3,32	N	9,63

b) Säurehydrolytische Glucoseabspaltung.

1 g dinitrophenyliertes Glucosid wurde in 500 ml Eisessig in der Hitze gelöst und unter Erwärmen 450 ml Wasser und 5 ml 25 %ige Salzsäure portionsweise zugegeben. Auf siedendem Wasserbad wurde 3 Stunden am Rückfluß unter CO₂-Atmosphäre erhitzt. Dann wurden weitere 4,5 ml 25 %ige

Salzsäure zugegeben und nochmals 3,5 Stunden erhitzt. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus. Die Flüssigkeit wurde im Vakuum auf etwa 20 ml eingeeengt, mit Wasser auf 250 ml verdünnt, mit einer Glasfilternutsche abgesaugt und mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Die Ausbeute betrug 705 mg.

Eine geringe Menge dieses Produktes wurde nochmals -wie oben angegeben- mit Säure gekocht. Bei Prüfung mit Anilinchthalat (25) konnte kein Zucker mehr nachgewiesen werden.

Das Analysenergebnis stimmt auf ein Tri-DNP-aglucon.

$C_{36}H_{24}O_{17}N_6$	Ber.	C	53,20	H	2,88	N	10,33
MG: 812,6	Gef.	C	53,31	H	3,10	N	10,20

Theoretische Werte für ein Tetra-DNP-aglucon:

C	51,52	H	2,69	N	12,65
---	-------	---	------	---	-------

Das Filtrat des Tri-DNP-aglucons wurde im Vakuum eingedampft und in dem Lösungsmittel n-Butanol:Pyridin:Wasser (3:2:1,5) aufsteigend chromatographiert. Es konnte Dinutrophenol (gelber Fleck mit Rf-Wert 0,81) nachgewiesen werden.

2. Abbau des Tetramethoxypiceatannolmonoglucosids.

a) Darstellung des Tetramethoxyglucosids.

400 mg Piceatannolmonoglucosid wurden in 100 ml Äthanol gelöst und im Verlauf von 10 Tagen 6 mal Diazomethan zudestilliert, das aus je 4,28 g p-Tolylsulfonylmethylnitrosamid entwickelt wurde. Die Lösung wurde im Vakuum auf 12 ml eingeeengt und das methylierte Produkt mit 130 ml Wasser ausgefällt. Es schied sich zunächst ein Öl ab, das durch mehrtägiges Stehen im Kühlraum erstarrte. Die rotbraune, amorphe Substanz wurde abfiltriert und im Vakuumexsikkator getrocknet.

Die Ausbeute betrug 348 mg, das sind 78 % der Theorie.
Die Substanz ist gut löslich in Methanol, Äthanol, Tetrahydrofuran und Aceton, schwer löslich in Wasser.

Aus den Analysenwerten geht hervor, daß es sich um ein Piceatannol-tetramethoxy-monoglucosid handelt.

$C_{28}H_{36}O_{10}$	Ber.	C	63,18	H	6,77	CH_3O-	23,31
MG:532,57	Gef.	C	63,10	H	6,78	CH_3O-	22,83

b) Das Methoxyaglucon.

190 mg Tetramethoxymonoglucosid wurden in 125 ml Methanol gelöst und dazu 10 ml Wasser und 5 ml 25 %ige Salzsäure gegeben. Dabei zeigte sich, daß sofort bei Zugabe der Salzsäure ein Farbumschlag der Lösung von gelb nach rosa stattfand. Unter Durchleiten von CO_2 wurde 5 Stunden auf dem Wasserbad am Rückfluß gekocht. Nach dieser Zeit wurden nochmals 10 ml Wasser und 5 ml 25 %ige Salzsäure zugefügt und erneut 5 Stunden erhitzt. Das Methanol-Wassergemisch wurde nun im Vakuum auf 10 ml eingengt und 3 mal mit je 30 ml Essigester ausgeschüttelt. Der Essigester wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Dabei blieb eine rote, ölige Schmiere zurück, die in 2 ml Äthanol aufgenommen wurde. Nach Versetzen mit 20 ml Wasser fiel das Aglucon in Form von rotbraunen, öligen Tröpfchen aus, die über Nacht erstarrten. Die ockerbraune, amorphe Substanz wurde abfiltriert und im Vakuum-exsikkator getrocknet.

Die Substanz ist gut löslich in Tetrahydrofuran, Äthanol und Methanol, sehr schwer löslich in Wasser.

Auch hier konnte bei nochmaligem Verseifen kein Zucker mit Anilinphthalat mehr nachgewiesen werden.

Die Ausbeute betrug 112 mg.

Die Analysenwerte stimmen besser auf ein Trimethoxyaglucon als auf ein Tetramethoxyaglucon.

Trimethoxyaglucon:

$C_{21}H_{24}O_5$	Ber.	C	70,76	H	6,78	CH_3O-	26,19
MG: 356,4	Gef.	C	69,93	H	7,07	CH_3O-	26,42

Theoretische Werte für ein Tetramethoxyaglucon:

C	71,33	H	7,08	CH_3O-	33,62
---	-------	---	------	----------	-------

3. Abbau des Acetylpiceatannolmonoglucosids.

a) Darstellung des Acetylglucosids.

325 mg Piceatannolmonoglucosid wurden in 20 ml Pyridin gelöst und mit 4 ml frisch über Phosphorpentoxyd destilliertem Essigsäureanhydrid versetzt. Es wurde über Nacht stehen gelassen und anschließend 30 Minuten am Rückfluß auf 80° C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 240 mg geschmolzenes Natriumacetat und 2,4 ml Essigsäureanhydrid zugegeben und so lange auf dem Wasserbad erhitzt, bis eine klare gelbe Lösung entstanden war. Es wurde weitere 3 Stunden am Rückfluß erhitzt und anschließend das überschüssige Essigsäureanhydrid im Vakuum entfernt. Nach Zusatz von 20 ml Wasser und 15 minütigem Stehen wurde filtriert und das restliche Essigsäureanhydrid durch mehrstündiges Stehen unter Wasser zersetzt. Nach dem Filtrieren wurde die weiße Substanz in heißem Äthanol gelöst und fiel beim Abkühlen stäbchenförmig aus.

Die Ausbeute betrug 500 mg, das sind 93 % der Theorie. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurde ein konstanter Schmelzpunkt von 148° C gefunden.

Die Kristalle sind löslich in Tetrahydrofuran, Eisessig, heißem Methanol und Athanol, unlöslich in Wasser.

Analysenwerte des Acetylglucosids (mit 8 Acetylgruppen):

$C_{40}H_{44}O_{18}$	Ber.	C	59,11	H	5,42	Acetyl	42,32
MG: 812,5	Gef.	C	58,99	H	5,49	Acetyl	42,80

Bei einer weiteren Umsetzung von 410 mg des gleichen Monoglucosides konnten 650 mg Acetylglucosid gewonnen werden, das sind 96 % der Theorie.

In verschiedenen Ansätzen mit Monoglucosiden aus anderen Ernten konnte, bei gleicher Aufarbeitung, kein kristallines Acetylderivat erhalten werden.

b) Qualitative Reaktionen des Acetylglucosides.

1.) Prüfung auf freie, phenolische Hydroxylgruppen:

Eine Lösung von 4 mg Acetylglucosid in 2ml Tetrahydrofuran wurde tropfenweise mit 2 %iger Eisen-III-chloridlösung versetzt; es trat keine Farbtönung auf, die auf freie, phenolische Hydroxylgruppen hinwies.

2.) Prüfung auf ungesättigten Charakter mit KMnO_4 :

3 mg der Acetylverbindung wurden in 2 ml frisch über KMnO_4 destilliertem Tetrahydrofuran gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von KMnO_4 in Aceton versetzt. Es trat sofort Entfärbung und Braunsteinausscheidung ein.

3.) Prüfung auf ungesättigten Charakter mit Bromwasser:

Eine Lösung von 3 mg Acetylglucosid in Tetrahydrofuran wurde tropfenweise mit Bromwasser versetzt, wobei ebenfalls Entfärbung eintrat.

c) Oxydative Spaltung des Acetylglucosides.

375 mg Acetylglucosid wurden in 30 ml frisch über KMnO_4 destilliertem Tetrahydrofuran gelöst und so lange eine Lösung von KMnO_4 in Aceton zugegeben, bis keine Entfärbung mehr eintrat. Von dem gebildeten Braunstein wurde abfiltriert und die Lösung durch Zusatz einiger Tropfen Pyrosulfitlösung entfärbt. Die klare, leicht gelblich gefärbte Lösung wurde im Vakuum auf 5 ml eingeeengt.

d) Entacetylierung und Isolierung der Spaltprodukte.

Das eingeengte Filtrat wurde mit 10 ml 1n Natronlauge -durch die vorher 1/2 Stunde lang Stickstoff geleitet worden war- versetzt, wobei sich das Reaktionsgemisch goldgelb färbte. Unter sorgfältigem Sauerstoffausschluß wurde auf dem Wasserbad 30 Minuten auf 80° C erhitzt und nach Abkühlen mit 2n Salzsäure schwach angesäuert. Dabei hellte sich die Farbe der Lösung etwas auf. Nach dem Ansäuern wurde 3 mal mit Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherauszüge (150 ml) über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft.

Die Ausbeute betrug 80 mg eines zähflüssigen, gelblichen Öles.

Die wässrige Phase wurde sofort nach dem Ausschütteln genau neutralisiert und im Vakuum zur Trockne gebracht.

e) Säulenchromatographische Auftrennung des Ätherauszuges und Identifizierung des Spaltproduktes.

60 mg des Ätherauszuges wurden in 1 ml Wasser-Methanol 1:1 gelöst und sorgfältig auf eine Polyamidsäule (Durchmesser 2,5 cm, Füllhöhe 15 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit Wasser, wobei ein scharfer, hellgelb gefärbter Ring ausgewaschen werden konnte.

Das wässrige Eluat, das mit Eisenalaunlösung eine olivgrüne Färbung ergab, wurde im Vakuum zur Trockne gebracht. Die Ausbeute betrug 14 mg einer gelblichweißen, teilweise kristallin aussehenden Substanz. Versuche, die ausgeführt wurden um diese nicht sehr beständige Substanz völlig zu kristallisieren und ihren Schmelzpunkt zu bestimmen, hatten keinen Erfolg.

Die gefundenen Analysenwerte stimmten auf den von W.Pauckner (27) beschriebenen C₁₀-Körper:

$C_{10}H_{12}O_3$	Ber.	C	66,72	H	6,71
MG:180,19	Gef.	C	66,50	H	6,44

Von dem erhaltenen Spaltprodukt wurde das UV-Absorptions-spektrum aufgenommen (Abb. 13); es zeigt völlige Übereinstimmung mit dem von W. Pauckner für den C_{10} -Körper angegebenen Kurvenverlauf (27).

Von der neutralisierten und eingedampften wässrigen Phase wurde ein Teil 8 Stunden mit Salzsäure bei $80 - 90^{\circ} C$ hydrolysiert und das Hydrolysat papierchromatographisch untersucht. Der andere Teil der wässrigen Phase wurde in der früher beschriebenen Weise mit Luitase behandelt und versucht den Zucker enzymatisch abzuspalten. Aber weder hier noch nach der Säurehydrolyse konnte freie Protocatechusäure nachgewiesen werden.

4. Abbau des Tetramethoxyacetylmonoglucosides.

a) Darstellung des Tetramethoxyacetylmonoglucosides.

250 mg Tetramethoxyglucosid (dargestellt nach der auf Seite 64 angegebenen Vorschrift) wurden mit 0,48 g wasserfreiem Natriumacetat vermischt und 4,8 ml Essigsäureanhydrid zugegeben. Es wurde 2 Stunden am Rückfluß bei $80^{\circ} C$ erhitzt und anschließend das überschüssige Essigsäureanhydrid im Vakuum entfernt. Nach Zusatz von 20 ml Wasser und 15 minütigem Stehen wurde filtriert und das restliche Essigsäureanhydrid durch mehrstündiges Stehen unter Wasser zersetzt. Nach dem Filtrieren wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

Die Ausbeute an rotbrauner, schmieriger Substanz betrug 294 mg, das sind 89 % der Theorie.

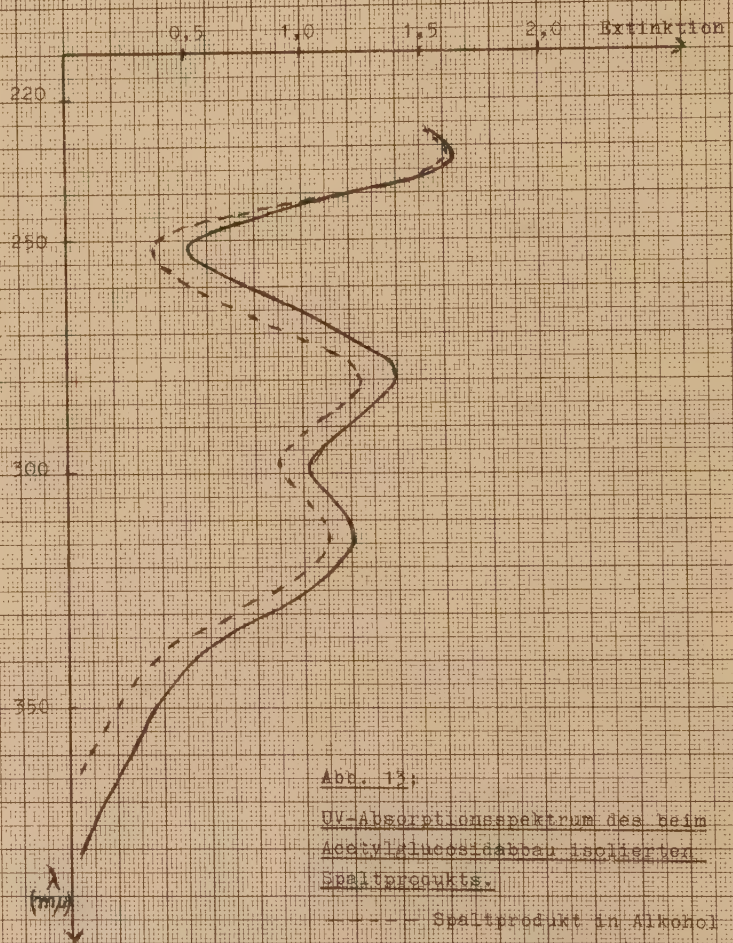


Abb. 13:

UV-Absorptionsspektrum des beim
Acetylglucosidabbau isolierten
Spaltprodukts.

- - - Spaltprodukt in Alkohol
- von W. Fauckner (27) isoliertes Trihydroxytetralin.

b) Oxydative Spaltung der Verbindung.

270 mg Tetramethoxyacetylmonoglucosid wurden in 20 ml trockenem Aceton gelöst und eine Lösung von 170 mg Kaliumpermanganat (berechnete Menge) in 20 ml getrocknetem Aceton zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1/2 Stunde am Rückfluß auf 50° C erhitzt. Der Rückflußkühler war mit einem Calciumchloridrohr versehen. Nachdem die Lösung entfärbt war wurde vom abgeschiedenen Braunstein abfiltriert, mit Aceton gewaschen und das Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht.

Der abfiltrierte Braunstein wurde in 10 ml wässriger Pyrosulfitlösung gelöst, mit Salzsäure schwach angesäuert und 3 mal mit zusammen 50 ml Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft, wobei eine rein weiße Substanz zurückblieb. Diese Verbindung ergab im Lösungsmittel Methanol:Wasser (4:1) einen mit Veratrumsäure gleichlaufenden, mit Bromkresolgrün gelb färbenden Fleck. Mit diaz. Benzinidin gibt die Substanz ebensowenig wie Veratrumsäure eine Färbung. Das UV-Spektrum zeigt übereinstimmend mit Veratrumsäure ein Minimum bei 235 mμ und ein Maximum bei 258 mμ.

Nach Umkristallisation wies die Verbindung einen Schmelzpunkt von 174° auf. Der Mischschmelzpunkt mit synthetischer Veratrumsäure ergab keine Depression.

Die Ausbeute von 48 mg entspricht 69 % der Theorie.

c) Entacetylierung und Hydrolyse.

Das nach der Spaltung mit KMnO_4 erhaltene und im Vakuum zur Trockne eingedampfte Filtrat (vgl. III B 4 b) wurde in einem Kolben in 15 ml Alkohol gelöst und mit 5 ml 4n-Natronlauge versetzt, durch welche vorher 1/2 Stunde N_2 geleitet worden war. Durch die Lösung wurde nochmals N_2 geleitet und unter sorgfältigem Sauerstoffausschluß 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde

mit Salzsäure auf pH 7 gebracht, im Vakuum auf 5 ml eingengt und nach Ansäuern auf pH 1-2 mehrmals ausgeäthert. Die wässrige Phase wurde sofort genau neutralisiert und im Vakuum zur Trockne gebracht.

Die Hauptmenge der wässrigen Phase, die größtenteils aus anorganischen Salzen bestand, wurde in 5,3 ml n/20 Acetatt-puffer gelöst, nach Versetzen mit 2,3 ml dialysierter Luitaselösung mit Wasser auf 80 ml aufgefüllt und 43 Stunden bei 35° im Brutschrank gehalten. Anschließend wurde im Vakuum auf 10 ml eingengt, zweimal mit Essigester und zweimal mit Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Auszüge mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde das ausgeschüttelte Produkt papierchromatographisch untersucht.

In den Lösungsmitteln Methanol:Wasser (4:1) und m-Kresol: Eisessig:Wasser (50:2:48) konnte eine mengenmäßig überwiegende, im UV-Licht fluoreszierende Substanz neben geringen Mengen Isovanillinsäure nachgewiesen werden.

Auch nach säurehydrolytischer Zuckerabspaltung mit 1n-HCl an einem kleineren Teil der eingedampften wässrigen Phase konnte dieser Befund, nach papierchromatographischer Untersuchung, bestätigt werden.

Das Substanzgemisch wurde als Strich auf ein Chromatogramm aufgetragen und mit Methanol:Wasser (4:1) 17 Stunden aufsteigend chromatographiert. Anschließend wurde mit dem Föhn getrocknet, die entsprechende, fluoreszierende Zone herausgeschnitten, mit absolutem Alkohol eluiert und das UV-Absorptionsspektrum sowohl in reinem Alkohol als auch -wie auf Seite 59 beschrieben- in alkoholischer Aluminiumchloridlösung gemessen.

Aus Abb. 14 geht hervor, daß die Substanz in Äthanol ein Maximum bei 276 m μ aufweist. Bei Zugabe von Aluminiumchlorid und wasserfreiem Natriumacetat ist keine Verschiebung des Maximums zu beobachten, das heißt, es ist keine Ausbildung eines Aluminiumkomplexes möglich. Das

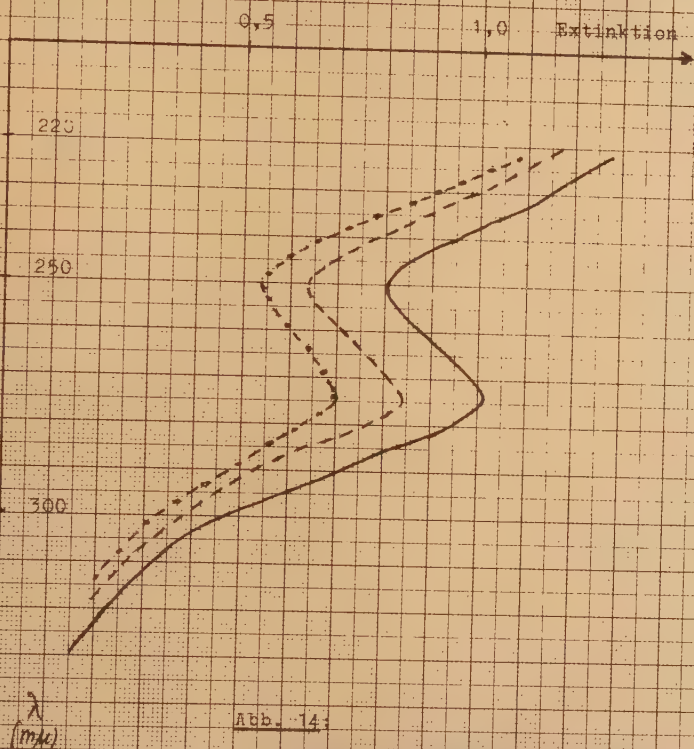


Abb. 14:

UV-Absorptionsspektrum des beim Abbau
des Tetramethoxyacetvlmonoglucosides
erhaltenen Spaltproduktes.

- — — — Spaltprodukt in Äthylalkohol
- • • • Spaltprodukt in alkoholischer
AlCl₃-Lösung + CH₃COONa
- — — — von H. Endres isolierte
Dimethoxy-hydroxy-tetralin-
carbonsäure.

UV-spektroskopische und papierchromatographische Verhalten dieser Substanz ist mit der von H. Endres (7) aus Trimethoxypiceatannol erhaltenen Dimethoxy-hydroxy-tetralin-carbonsäure identisch.

5. Katalytische Hydrierung des Piceatannolmonoglucosides.

Eine Spatelspitze Palladiumkatalysator wurde zu 30 ml Methanol gegeben und durch diese Mischung ein kräftiger Stickstoffstrom geleitet. Anschließend wurde so lange hydriert, bis der Katalysator gesättigt war. Dann wurden 25 mg kristallisiertes und papierchromatographisch einheitliches Piceatannolmonoglucosid zugegeben und unter Schütteln 3 Stunden hydriert. Nach Filtrieren wurde das Filtrat im Vakuum unter CO_2/SO_2 zur Trockne gebracht.

Die papierchromatographische Untersuchung der kat. hydr. Piceatannolmonoglucoside (Lösungsmittel: n-Butanol:Eisessig:Wasser, 4:1:5) zeigte jeweils 2, im UV-Licht nicht fluoreszierende Flecken (Abb. 10) mit den R_f -Werten 0,38 und 0,63.

Anhang.

Identifizierung von d-Catechin.

Roher, d. h. nicht an Polyamid gereinigter Alkoholextrakt wurde mit Äther extrahiert, der Auszug nach Verjagen des Äthers als Strich auf ein Chromatogramm aufgetragen und mit dem Lösungsmittel n-Amylalkohol-wassergesättigt aufsteigend chromatographiert. Die, das d-Catechin enthaltende Zone wurde ausgeschnitten, der erhaltene Streifen mit Äthanol eluiert und der Rückstand nach Abdampfen des Alko-

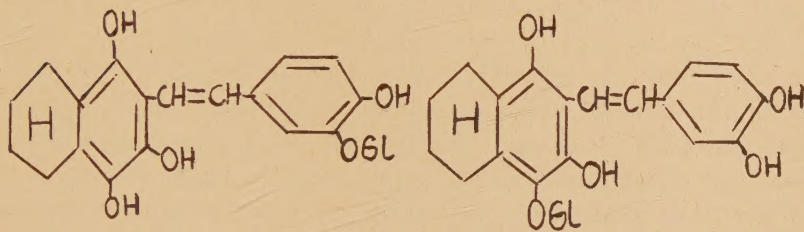
hols zweidimensional mit den Lösungsmitteln n-Butanol:Eis-
essig:Wasser (4:1:5) und Äthanol:Wasser (1:3) getrennt.
Das d-Catechin wurde nach Ausschneiden des entsprechenden
Fleckens mit Äthanol herausgelöst und das UV-Spektrum in
äthanolischer Lösung aufgenommen. Übereinstimmend mit dem
UV-Absorptionsspektrum von d-Catechin wurde ein Maximum
bei 280 μ und ein Minimum bei 250 μ gemessen.

IV. Zusammenfassung.

1. Der aus dem Bast frisch gefällter Fichten nach erschöpfender Extraktion mit Essigester gewonnene Alkohol-extrakt enthält 33 % Gerbstoff und repräsentiert 20 % des Gesamtgerbstoffes.
2. Es wird eine neue Methode zur Gerbstoffanreicherung beschrieben. Diese Trennung beruht auf der unterschiedlichen Adsorption von Gerbstoffen und Nichtgerbstoffen an Polyamid. Es konnten so 70 % des im Alkoholextrakt enthaltenen Gerbstoffes mit einer Anteilzahl von 84 gewonnen werden.
3. Die von der Polyamidsäule nicht eluierbaren Anteile bestehen zum Teil aus kondensiertem Catechin.
4. Papierchromatographisch kann die Anwesenheit von geringen Mengen Catechin im Alkoholextrakt nachgewiesen werden.
5. Das hochangereicherte Gerbstoffgemisch enthält 20 % gebundene Glucose.
6. Das nach Zuckerabspaltung erhaltene Aglucongemisch kann an einer Polyamidsäule in 6 Fraktionen aufgetrennt werden. Neben den bereits von Graßmann, Endres und Mitarbeiter aus dem Essigesterextrakt isolierten Agluconen wird ein weiteres, mit 2 % am Gemisch beteiligtes Aglucon gefunden. Auf Grund der UV- und IR-Spektren kann auf eine enge chemische Verwandtschaft mit Piceatannol geschlossen werden.
7. Das Glucosidgemisch des Alkoholextraktes enthält rund 50 % Piceatannolmonoglucosid. Außer dieser Substanz kann noch papierchromatographisch Piceatannol, Dihydropiceatannolmonoglucosid, Quercetinmonoglucosid, 1,2,3,4-Tetrahydro-5,7,8-trihydroxynaphthalinmonoglucosid und Catechin nachgewiesen werden. Ein auffälliger Unterschied zwischen dem Alkohol- und Essigesterextrakt ist das Vorkommen des kondensierten Catechins, dessen An-

wesenheit wohl die bessere Gerbwirkung des Alkoholextraktes mitbedingt.

8. Durch den Abbau mehrerer Piceatannol-monoglucosid-derivate und durch katalytische Hydrierung kann gezeigt werden, daß das Piceatannolmonoglucosid aus 2 isomeren Monoglucosiden besteht. Die Glucose ist teils in m-Stellung der Protocatechusäurehälfte, teils in 4-Stellung der Tetralinhälfte gebunden.



Lebenslauf.

Am 13. 11. 1931 wurde ich als erstes von drei Kindern des
gefallenen Steuerinspektors Anton Leppmeier und seiner
 Ehefrau Anna, geb. Wagner, in Ingolstadt geboren. Von
 1938 - 1942 besuchte ich die Volksschule in Kempten/Allgäu
 und trat dann an die dortige Oberrealschule über. Im Juni
 1950 legte ich die Reifeprüfung ab und begann im Winter-
 semester 1950/51 das Studium der Chemie an der Phil.-
 Theol. Hochschule in Dillingen/Donau. Im Sommersemester
 1951 wechselte ich an die erweiterte Hochschule in Regens-
 burg über, wo ich 1954 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab-
 legte. Der Diplom-Chemiker-Hauptprüfung unterzog ich mich
 im Juni 1956 an der Universität München und fertigte dort
 meine Diplomarbeit über das Thema: "Untersuchungen über
 die Diadochie zwischen Vanadium und Phosphor in Alkali-
 Erdalkaliphosphaten" unter Anleitung von Prof. Dr. R.
 Klement an. Anschließend führte ich meine Doktorarbeit am
 Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in
 München durch.

